



TITLE:

バクテリオファージT3DNA詰込み
分子機構の解析(Dissertation_全文
)

AUTHOR(S):

森田, 美代

CITATION:

森田, 美代. バクテリオファージT3DNA詰込み分子機構の解析. 京都大学
, 1995, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1995-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3099624>

RIGHT:

許諾条件により本文は2011-04-01に公開

2
学位申請論文

バクテリオファージ T3 DNA 詰込み分子機構の解析

森 田 美 代

目次

目次	2
要旨	3
序論	5
結果及び考察	9
第一部 DNA詰込み蛋白質を中心としたDNA詰込み機構の解析	
結果	9
I DNA移送のエネルギー論	9
II 詰込み蛋白質大サブユニットgp19の機能領域に関する研究	11
1. 部位特異的変異gp19を用いた機能領域の解析	11
2. ATPによるgp19の構造変換の解析	17
3. gp19のプロヘッド結合領域の解析	18
考察	27
第二部 DNA移送を中心としたDNA詰込み機構に関する研究	
結果及び考察	36
材料と方法	40
表及び図	49
謝辞	98
引用文献	99

要旨

二本鎖DNAバクテリオファージ（以下ファージと略す）のDNA詰込みは二種の詰込み蛋白質の働きにより、コンカテマーからゲノムDNAを切り出し（コンカテマープロセッシング）、ATP加水分解エネルギーを利用して頭殻内へ詰め込むという、ファージ間で基本的に共通の分子機構によると考えられている。T3ファージでは、精製した因子のみからなるDNA詰込み反応系（精製 *in vitro* 系）が確立されており、この系を用いてDNA詰込み反応の分子機構の解析を行なった。精製 *in vitro* 系は構成要素が全て揃うと、高いATPase活性を示す。DNA詰込み阻害剤を用いて、精製 *in vitro* 系のATPase活性を、DNA詰込みに共役した *pac* ATPase活性と非共役の *nonpac*-ATPase活性とに分離することに成功した。*pac* ATPase活性の解析から計算上1分子のATPにより約1.8bpのDNAが頭殻内へと移送されることを示した。

詰込み蛋白質大サブユニット gp19（586アミノ酸残基）は、次のような点からDNA詰込みにおいて中心的役割を担うと考えられる。1、DNA詰込み反応に必須である：2、頭殻前駆体（プロヘッド）上のDNA入口構造（コネクター）に結合する：3、gp19は精製 *in vitro* 系において唯一のATP結合蛋白質であり、gp19の諸性質（非特異的エンドヌクレアーゼ活性、プロヘッド結合能、プロテアーゼ感受性）がATPとの相互作用を介して変化する。DNA詰込みの分子機構を理解するために、gp19の機能領域の解析を行った。gp19に見いだされるATP (Mg^{2+}) 結合共通配列に1アミノ酸置換を導入し、変異gp19の機能解析から以下の結果を得た。1、G61及びH344への変異導入はgp19の構造変化を引き起こし、それによりgp19はATPとの相互作用能を特異的に喪失した：2、G429への変異導入は *pac* ATPase活性とDNA移送の脱共役を引き起こした：3、非特異的エンドヌクレアーゼ活性を喪失した数種の変異gp19が、DNA詰込みに共役した特異的DNA切断活性を同時に失ったことから、DNA詰込みにおけるコンカテマープロセッシングにgp19が直接機能していることを示した。また、C末端欠失変異gp19の解析から、L571 - D576（領域I）がプロヘッド結合に関与しており、また類似配列が他のファージの大サブユニットにも確認された。この配列に相当する合成ヘキサペプチドを用いた実験から、プロヘッド結合領域は機能的に領域I及びそれに続くC末端10アミノ酸残基からなる領域IIに分けられ、前者はプロヘッド結合及びDNA詰込みにおいて中心的機能を、後者はgp19のプロヘッドへの結合を安定に保ち、領域Iとプロヘッドとの機能的相互作用を保証する楔的役割を担う

ことが示された。gp19のATPとの相互作用によるプロテアーゼ感受性変化は、gp19蛋白質のATPによるグローバルな構造変換に起因するものであり、gp19には3つの構造上のドメインが存在することを明らかにし、gp19の各機能との相関を考察した。これらの結果を基に、詰込み蛋白質の関与を明確にしたDNA移送機構のモデルを提唱した。

精製 *in vitro* 系を用いて、頭殻内へのDNA移送速度が、頭殻内のDNA正上昇に伴い低下することを初めて示し、移送速度の変化と頭殻の拡大変換並びにコンカテマープロセッシング機構との関連を考察した。

序論

DNA複製、転写、翻訳、各代謝調節、シグナル伝達機構などの複雑な生命反応は、秩序だった超分子構造体の関与の基で進行することが知られている。蛋白質分子が実際にその機能を発揮するためには、正しく折り畳まれ、一定の形を持たねばならないように、蛋白質や核酸などの様々な高分子の複合体としての超分子構造体もまた、その機能発現のためには正しく組み立てられる必要がある。このような超分子構造体を、ある機能を実現する装置であると捉えると、サブユニットという部品からなる装置は、高度に秩序だったサブユニット間の一連の反応を通して、組み立てられる。サブユニット間の反応には特異的認識を介した相互作用が必要とされる。装置構築は、単なるサブユニット間の静的な接触ではなく、あるサブユニットが装置に組み込まれると、そのサブユニットあるいは装置全体の構造変換を引き起こし、それが次のサブユニットとの相互作用を可能にするといったような、サブユニットあるいは装置全体の秩序立った、動的な機能発現（活性化）によって達成される場合もある。リボゾーム、鞭毛モーター、筋繊維、ウイルス構築等は、このような超分子装置構築機構のモデルとして、解析が進んでいる。中でもウイルス、特にバクテリオファージは核酸と蛋白質からなる超分子構造体であり、比較的単純な構造を持ち、遺伝学的基礎が確立しており変異が容易に得られることなどから、遺伝子機能と構造構築との対応がつけやすい。即ち、時間的に制御を受けた遺伝子発現から、発現された蛋白質間あるいは蛋白質-DNA間の相互作用に基づく分子構築という一貫した流れを明確にすることが可能であり、超分子構造体構築過程を知る上で優れたモデル系である。

二本鎖DNAバクテリオファージ（以下ファージと略す）の頭部は一般に、1；正二十面体あるいはそれが5回対称軸に沿って伸びたような形をしている、2；5回対称の頭殻の一頂点に、12回対称性を持つシリンダー状の構造体（コネクター）が局在し、6回対称の尾部との間を連結している、という共通の特徴を持つ(Serwer, 1989)。

頭殻内にはゲノムDNAが高度に濃縮して詰め込まれている。DNA詰込み反応は、成熟粒子には存在しない2種の詰込み蛋白質の関与のもとにゲノム長DNAをコンカテマーから切り出し（後述）、ATPの加水分解のエネルギーを利用して、詰込みに先だって形成される頭殻前駆体（プロヘッド）にDNAを移送・濃縮する反応である。このようなDNA詰込み反応は、ファージ粒子形成過程の中でも、最も動的な過程であり、全てのファージで

基本的に共通の分子機構によると考えられている (Earnshaw and Casjens, 1980)。

現在知られているDNA複製機構では、線状二本鎖DNAの5' 端の完全複製は不可能である。真核生物では染色体DNAの末端に存在するテロメア構造がDNA末端複製を保証していると考えられている (Greider and Blackburn, 1987)。またファージでは、感染後ゲノムDNAが末端反復配列を介して数分子連なったコンカテマーを形成し (例外; ϕ 29とその近縁ファージ)、詰込みに伴ってコンカテマーDNAからゲノム長DNAを切り出すこと (コンカテマープロセッシング) により末端複製を可能にしている (Watson, 1972)。

コンカテマープロセッシングと頭殻内へのDNA移送を含むDNA詰込み反応には、詰込み蛋白質が重要な役割を持つことが、多くのファージで示されている (Black, 1989; Davidson *et al.*, 1991)。詰込み蛋白質は、分子量の異なる2種のサブユニットからなる非頭殻蛋白質であり、一般に小サブユニットはDNA結合能をもち、DNA詰込み反応に促進的に働くが必須ではない (Black, 1989)。一方大サブユニットはプロヘッド結合能をもち、そのアミノ酸配列中にATP結合共通配列が存在することが確認されており、DNA詰込み反応に必須である (Guo *et al.*, 1987a, b; Hamada *et al.*, 1987)。DNA詰込み反応は、(1) 自己DNAの認識、及び詰込み開始に必須であるDNA端を生じるコンカテマーの切断 (開始切断)、(2) DNAの頭殻内への移送、(3) 1ゲノム長あるいは頭殻一杯 (headful) のDNAの詰込み後、コンカテマーDNAからの切り離し (終結切断)、という3つの素過程に分けられる。詰込み蛋白質が、これらの各素過程にどの様に関与しているのかを調べることは、DNA詰込み反応機構を知るために重要なことである。

λ ファージでは、詰込み蛋白質の機能に関する研究が比較的進んでいる。大小サブユニットは結合してターミネースと呼ばれるホロエンザイムを構成し、小サブユニット gpNu1を介してゲノム末端に位置するDNAの特異的配列 (cos 配列) を認識、結合する。その後、斜交いにニックを導入し、二本鎖DNAを開裂することで開始切断を行う。ターミネースは切断したDNA端に結合し、これがプロヘッドと結合することにより、DNAの頭殻内への移送が開始すると考えられている (Feiss, 1986; Murialdo, 1991)。遺伝学的研究により、プロヘッドとの結合は大サブユニット gpAを介して起こることが示唆されている (Sippy and Feiss, 1992)。

本研究で用いたT3ファージは、二本鎖DNAファージの中でも比較的小型で、約38.5kbのゲノムDNAの両端に230bpの同方向の末端重複配列 (TR配列) を持つ (Fujisawa and Sugimoto, 1983)。多くのファージで用いられている感染菌抽出液からなる粗 *in vitro* 詰込

み系では、反応因子や反応中間体の同定がむずかしく、ファージDNA詰込み反応の分子レベルでの解析は困難であった。しかし、T3ファージでは精製した因子（プロヘッド、詰込み蛋白質であるgp18及びgp19、DNA）のみからなる *in vitro* 詰込み系（精製 *in vitro* 詰込み系）が開発されており、DNA詰込み反応の分子レベルでの解析を可能にしている (Hamada *et al.*, 1986b)。この系の解析により、以下に述べるようなDNA詰込み反応経路が明らかにされている（図1）。プロヘッドはほぼ球形の比較的不安定な超分子構造体であり、約420分子の主要頭殻蛋白質gp10と少量の微量頭部蛋白質からなる（T7; Steven *et al.*, 1983）。プロヘッド上にはgp8の12量体からなるDNA入口構造（コネクター）が1頂点に局在し(Nakasu *et al.*, 1983)、ATP存在下で詰込み蛋白質大サブユニットgp19は、コネクターを介してプロヘッドに6分子結合する(Fujisawa *et al.*, 1991)。gp18は、詰込み基質となる線状二本鎖DNAの末端に結合し、更にATP存在下でこれがプロヘッド-gp19複合体と会合して、沈降係数50Sの詰込み前駆体（50S複合体）を形成する。ここまでの反応には、ATPはアロステリック因子として働くが、引き続いて起こるDNA移送にはATPの加水分解によるエネルギーが必要とされる(Shibata *et al.*, 1987a)。実際、精製 *in vitro* 系はATPase活性を示す(Hamada *et al.*, 1987)。DNA移送の途中で、ほぼ球形であったプロヘッドは正二十面体の非常に安定な構造へと拡大変換し、近縁のT7ファージでは成熟頭部の直径はプロヘッドの1.1-1.15倍、体積にして約1.5倍となる（Serwer, 1988）。DNA詰込み終了後、コネクターに尾部及び尾部繊維が集合し、感染性粒子が完成する。

精製 *in vitro* 系では、線状二本鎖DNAであれば、自他に関わらずいかなるDNAでも詰め込むので、上述したDNA詰込み反応の素過程のうち、(1)の素過程は再現できない。しかし、(2)及び(3)の素過程については、非常に効率良く再現され、この分子機構を知るためには優れた系であるといえる。本研究では、主に精製 *in vitro* 系を用いてDNA詰込みの分子機構の解析を行った。

これまでの研究から、大サブユニットgp19は単独で次のような機能を持つ多機能蛋白質である事が判っている。1；ATPあるいはgp18により抑制される、非特異的エンドヌクレアーゼ活性を持つ（Fujisawa *et al.*, 1990）。2；プロヘッド結合能を持つ。ただし、ATP存在下では結合比（gp19/プロヘッド）は6であるが、ATP非存在下では結合比が20-30となり、プロヘッドは不活化される（Fujisawa *et al.*, 1991）。3；精製 *in vitro* 系において唯一ATP結合能を持ち（Hamada *et al.*, 1987）、ATPの有無により、gp19のプロテアーゼ感受性が大きく異なる（Fujisawa *et al.*, 1991）。このように、gp19の持つ多機能がATPとの

相互作用を介して変化することや、DNA詰込み反応におけるATPの重要性から、gp19はDNA詰込み反応において中心的な役割を担う可能性が高い。従って、gp19の分子レベルでの解析は、DNA詰込み反応機構を理解するために重要である。第一部 I では、DNA移送とATPエネルギー消費との関係を明らかにするため、精製系の示すATPase活性の解析を行った結果を示す (Morita *et al.*, 1993)。第一部 II では、gp19の機能領域について以下の3点から解析を行った。(1) gp19の各機能とATP結合との関係を調べるために、ATP及びMg²⁺結合共通配列に部位特異的変異を導入し、各変異gp19の機能解析を行った (Morita *et al.*, 1994)。(2) gp19のATPによる機能変化は、ATPにより引き起こされる構造変換に関連していると考えられる。そこで、この構造変換の実態を把握することを試みた (Morita *et al.*, 1995)。(3) ATPによるgp19の構造変換はDNA詰込み活性を持つgp19-プロヘッド複合体形成を可能にする。DNA移送装置としてのgp19-プロヘッド複合体形成に関して、gp19のプロヘッド結合領域を決定し、gp19の構造変換とプロヘッド結合領域について考察した (Morita *et al.*, 1995)。第一部の結果を総合して、DNA移送機構のモデルを考察した。

DNA移送過程は、頭殻という限られた空間にATPエネルギーを利用して、DNAを高度に濃縮して詰め込むという、DNA詰込み反応において最も動的な過程である。第二部ではDNA移送速度を測定し、その速度変化と、プロヘッドの拡大変換やDNA切断などDNA詰込み反応における他の現象との関連を考察した。

結果及び考察

第一部 DNA詰込み蛋白質を中心としたDNA詰込み機構の解析

結果

I DNA移送のエネルギー論

(A) DNA移送に共役したATPase (*pac*-ATPase) の測定

バクテリオファージのDNA詰込みには一般にATPが必要とされる (Earnshaw and Casjens, 1980; Black, 1988)。T3の精製 *in vitro* 系は全ての構成要素が揃うと高いATPase活性を示す (Hamada *et al.*, 1987) (表1)。このATPase活性の特徴を詳しく調べた。

精製系におけるDNA詰込み反応後、反応液をPEIセルロースプレートによる薄層クロマトグラフィーにより展開してATP、ADP、AMPを分離し、各スポットの放射活性を測定した。ATPは精製系における加水分解の結果ADPと無機燐に分解し、AMPは現れなかった (図2)。

精製 *in vitro* 系では、線状二本鎖DNAであればいかなる種類のDNAでも頭殻内に詰め込まれるが、環状DNAもしくは一本鎖DNAは詰込みの基質にならない (Hashimoto, 1992)。しかし精製系に線状二本鎖DNAの代りに詰込み不可能なDNA (一本鎖DNA、環状DNA) あるいはRNAを添加しても、ATPase活性はDNAを加えないときと比較して10倍以上上昇した (表2)。つまり、精製系の示すATPase活性には、DNA移送に関係しない活性も共存していると考えられる。DNA移送のエネルギー論を考える際、DNA移送に共役したATPase活性 (*pac*-ATPase活性) と、移送に関係なく現れる活性 (*nonpac*-ATPase活性) とを分離する必要がある。

そこで、DNA詰込みの阻害剤であるエチジウムブロマイド及びアクチノマイシンD (Fujisawa *et al.*, 1987) を用いて、精製系のATPase活性に対する影響を調べた (表1)。前者は、全ての構成要素が揃っている精製系の示すATPase活性と共に、gp19単独あるいはgp19とDNAのみが示すATPase活性をも阻害した。一方後者は精製系の示すATPaseを特異的に阻害したので、以下の実験にはアクチノマイシンDを用いた。

表2に見られるように、詰込み基質とはならないDNA (一本鎖DNA、環状DNA) やRNAの添加により促進されるATPase活性は、アクチノマイシンDにより阻害されないが、

詰込み基質となるDNA（二本鎖T3DNA、線状pUC18DNA）により現れるATPase活性は約50%がアクチノマイシンDによる阻害を受けた。しかも、アクチノマイシンDにより阻害されないATPase活性の相対値は、添加した核酸の種類にかかわらずほぼ同じ値であった。

アクチノマイシンDが精製系の示すATPase活性にどのような影響を与えるかを、精製系に添加するアクチノマイシンD濃度を変えて測定した。対照としてT3DNAのかわりに詰込み基質とならない環状pUC18DNAを加えた精製系の示すATPase活性への影響も調べ、これと比較した（図3）。環状pUC18DNAを含む精製系のATPase活性は、アクチノマイシンDによる影響を受けなかった。一方、T3DNAを含む精製系のATPase活性はアクチノマイシンD濃度が増加するとともに減少し、 $1\mu\text{M}$ 以上では環状pUC18DNAの場合と同程度になり、それ以上低下することはなかった。同時に頭殻内へ移送されたDNA量の変化を調べたところ、アクチノマイシンD濃度が $1\mu\text{M}$ 以上になると、DNA移送も停止することが示された（図3挿入図）。従って、アクチノマイシンDにより阻害されるATPase活性は、DNA移送に共役したATPase活性であると結論できる。

以上の結果から、精製系の示すATPase活性について次の3点が明らかになった。1：精製系の示すATPase活性はDNA移送に共役した活性（*pac*-ATPase活性）と、詰込み基質とならないDNAもしくはRNAによっても現れる、DNA移送に非共役の活性（*nonpac*-ATPase活性）に分離できる。2：精製系の示す総ATPase活性とアクチノマイシンD添加時に示す*nonpac*-ATPase活性との差を求めることにより、*pac*-ATPase活性を算出できる。3：*pac*-ATPase活性とDNA移送に及ぼすアクチノマイシンDの阻害効果には、高い相関が見られる（図3、挿入図）。

（B）ATP1分子の加水分解により移送されるDNA量の測定

アクチノマイシンDを用いることにより、精製系におけるDNA詰込みに共役したATPase（*pac*-ATPase）活性の測定が可能になった。そこで、ATP1分子の加水分解により移送されるDNA量を知るために、*pac*-ATPase活性の時間経過及びDNA濃度依存性を調べた。図4に示されるように、*pac*-ATPase活性は標準反応液のDNAが、ほぼ全て詰め込まれる30分で頭打ちになった。反応液のDNA量を変化させると、*pac*-ATPase活性はDNA量に比例して変化した（図5）。これらの事実は*pac*-ATPaseにより加水分解されるATP量は頭部に詰め込まれるDNA量に比例することを示している。図3及び4の実験から、標準反応液の全DNA（ 3.85×10^{14} bp）の詰込みに、 2.16×10^{14} 分子が加水分解されており、

従ってATP1分子により約1.8 bpのDNAが移送されたことになる。この値は ϕ 29の精製 *in vitro*系で得られた値（約2bp/ATP）とよく一致する（Guo *et al.*, 1987b）。一方、*nonpac*-ATPase活性は一度活性化されるとDNAが反応液から無くなっても活性は残っており、またDNA濃度依存性もなかった。

II 詰込み蛋白質大サブユニット gp19の機能領域に関する研究

1 部位特異的変異gp19を用いた機能領域の解析

(A) 遺伝子19への部位特異的変異の導入及び変異gp19の精製

gp19は精製 *in vitro*系において唯一のATP結合蛋白質であり（Hamada *et al.*, 1987）、その多機能はATPとの相互作用を介して発現、かつ変化する。gp19のアミノ酸配列中にはATP結合共通配列（Rossmann *et al.*, 1974; Walker *et al.*, 1982）が三箇所、Mg²⁺（金属）結合共通配列（Berg, 1986）が二箇所見られ（表3、図6）、これらのアミノ酸残基が実際にATP結合に関与する可能性が高い。また、他のファージの詰込み蛋白質大サブユニット（T7gp19、 λ gpA、T4gp17、 ϕ 29gp16）においてもATP結合共通配列が存在する事が判っている（表3）（Guo, *et al.*, 1987b）。

図1で示したように、ATPはDNA詰込み反応においてアロステリック因子及びエネルギー源として関与することから、gp19はATPとの相互作用を介して、詰込み反応機構で中心的役割を担うと期待される。

そこで、DNA詰込み機構におけるgp19の役割を調べるために、gp19のATPまたはMg²⁺結合共通配列中の1アミノ酸残基を他の残基に置換した変異gp19を作製した。Kunkel *et al.* (1987)の方法に従い、DNAの1-3塩基を置換して変異遺伝子19を作製した（表4）。これらの変異遺伝子は、塩基置換により野生型遺伝子には無い制限酵素認識部位を生じるよう工夫されており、各制限酵素で切断後DNA断片の長さを観察することにより、変異遺伝子が組み込まれたベクターを選択した。最終的には、全ての変異遺伝子について目的の変異が導入されているかどうかを、DNAの塩基配列決定を行い確認した。

このようにして、Kimura and Fujisawa (1991)が作製した4種の変異gp19（gp19-G61D、gp19-G424E、gp19-K430T、gp19-H553L）に加え、新たに63番目のGをDに置換したgp19-

G63D、以下同様に、gp19-K64T、gp19-H344D、gp19-H347R、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-K370I、gp19-G429L、gp19-G429Rの9種の変異gp19を得た。変異gp19は主にgp19-wt（野生型gp19）と同じ方法で精製した。gp19-G61D、gp19-H344Dについては菌体内で多量発現させると、封入体を形成して不溶分画へ移行したので、塩酸グアニジンを用いて精製を行った。同条件で精製したgp19-wtは、通常の方法で精製したgp19-wtと精製系でのDNA詰込み比活性において差は見られなかった（データ省略）。

(B) 変異gp19の*in vitro*詰込み系におけるDNA詰込み活性

T3の*in vitro*詰込み系は、粗系と精製系の2種が開発されており、それぞれ次のような特徴を持つ。粗系は、T3 3'19'及び5'19'ファージの感染菌抽出液を混合したもので、これに粒子型T3DNAとgp19を加え、DNA詰込み反応を行う。粒子型DNAは抽出液中でコンカテマーを経て頭殻内へ詰め込まれる。精製系では、線状二本鎖DNAであればいかなるDNAも詰め込まれる。これらの*in vitro*詰込み系を用いて各変異gp19の詰込み活性を測定した（表5、図7）。粗*in vitro*系では、gp19-G61D、gp19-G63D、gp19-H344D、gp19-H347R、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-G424Eの詰込み活性は非常に低く、バックグラウンドと同程度のファージしか形成されなかった。

精製系ではgp19-G61D、gp19-H344Dは詰込み活性をほとんど示さず、またgp19-G63D、gp19-G367D、gp19-G429Rの詰込み活性は、gp19-wtの1/4 - 1/5程度であった。その他の変異gp19の詰込み活性はgp19-wtとほぼ同じであった。

(C) 変異gp19の非特異的エンドヌクレアーゼ活性

gp19-wtは単独で非特異的エンドヌクレアーゼ活性を示し、その活性はATPあるいはgp18により抑制される（Fujisawa et. al., 1990）。各変異gp19の非特異的エンドヌクレアーゼ活性を、環状pUC18E1TRDNAをATPの存在下あるいは非存在下でgp19と反応させて測定し、gp19-wtと比較した（図8）。精製系でのみ詰込み活性を示す変異gpのうちgp19-H347Rを除くものは全て（gp19-G63D、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-G424E）、非特異的エンドヌクレアーゼ活性を失っていた。gp19-G61D及びgp19-H344Dは非特異的エンドヌクレアーゼ活性を示したが、ATPによる抑制を受けなかった（データ省略、Kimura and Fujisawa, 1991）。他の変異gp19はgp19-wtと同じ挙動を示した。

(D) 変異gp19のTR配列特異的エンドヌクレアーゼ活性

TR配列を持つプラスミドDNAを線状化して、詰込み基質として精製*in vitro*系に加えると、DNA詰込みに共役した特異的DNA切断が起こる、即ち*in vivo*での詰込みと同方向(左方向)に詰め込まれた時、TR配列の左端で切断される(図9)。これは*in vivo*でのコンカマープロセッシングにおける、終結切断に相当する(Fujisawa et.al., 1990)。

図9に示したように、gp19-wtを含む精製系において、TR配列左端で切断を受けると、2.5kbと3.0kbのDNA断片が現れ、最終的には両断片ともに頭殻内へ詰め込まれてDNaseI抵抗性となる(Fujisawa et. al., 1990)。同様の結果が、gp19-K64T、gp19-H347R、gp19-K370I、gp19-G429R、gp19-G429R、gp19-K430T、gp19-H553Lについて得られた。一方、非特異的エンドヌクレアーゼ活性を失った変異gp19 (gp19-G63D、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-G424E) では、TR配列での切断によるDNA断片は観察出来なかった。しかし、DNase処理後、頭殻内のDNAを観察すると、3.0kbのDNA断片が確認出来た。この結果は、左方向にTR配列左端まで詰め込まれたDNAが切断を受けないまま、そこで詰込みが停止していることを示す。gp19-G61D、gp19-H344Dでは、特異的DNA切断が見られなかったが、これは詰込み活性を失ったためと考えられる。

(E) 変異gp19のトリプシンによる限定分解

gp19-wtをトリプシン等のプロテアーゼで限定分解すると、一定の分解パターンが見られ、ATPの添加によりこのパターンは変化し、プロテアーゼ抵抗性が増すことが判っている (Fujisawa et. al., 1991)。このことはATPとの相互作用を介して、gp19が構造変換することを示唆する。各変異gp19のプロテアーゼ感受性から、導入した変異による蛋白質構造への影響をみると共に、ATPによる各変異gp19のプロテアーゼ感受性変化を調べた(図10)。ここではプロテアーゼとしてトリプシンを用いているが、他のプロテアーゼを用いてもATPの有無による感受性変化が見られる(後述)ので、ATPによりATP結合共通配列のリジン残基(トリプシンの基質認識部位)がマスクされることに起因するのではない。gp19-wtにおいては、ATP非存在下では主に37.5 kDaの断片が生じ、ATP存在下では、トリプシン抵抗性が増加し、20倍量のトリプシンを反応に用いても、主に57.0 kDa、49.2 kDaの断片が現れるにとどまる。

gp19-G61D、gp19-H344Dを除く全ての変異gp19は、ATPの存在下、非存在下ともにgp19-wtと同様の挙動を示した(図10)。gp19-G61D、gp19-H344Dはともにgp19-wtより

もトリプシンに対して感受性が高く、分解パターンはgp19-wtとは異なっていた。また、ATPによるトリプシン感受性の変化も見られなかった。

(F) gp19-G61D及びgp19-H344Dのプロヘッド結合能

精製系ではDNA詰込み反応経路が分子レベルで明らかにされている(図1)。gp19は、アロステリック因子としてのATPの関与の元にプロヘッド1に対して6分子結合する。ATP非存在下では、gp19はプロヘッドに過剰に結合し、このgp19-プロヘッド複合体は詰込み活性を不可逆的に失う(Fujisawa et al., 1991)。

gp19-G61D、gp19-H344Dはともに詰込み活性を失っており、エンドヌクレアーゼやトリプシンによる限定分解で示されたように、ATPとの相互作用能を欠いていると考えられる。プロヘッド結合については、ATPと相互作用出来ないため、プロヘッドに過剰に結合するか、あるいはプロヘッド結合能自体を失っているかどちらかが予想される。そこで、ATP存在下、非存在下でgp19-G61Dあるいはgp19-H344Dをプロヘッドと反応させてgp19-プロヘッド複合体を分離し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、変異gp19のプロヘッド結合能を調べた(図11)。その結果これらの変異gp19は、ATPの有無に関わらず、ATP非存在下でのgp19-wtと同様に、プロヘッドに過剰に結合した。

(G) 変異gp19を含む精製 *in vitro* 系のATPase活性の測定

上述したように、精製系の示すATPase活性は、詰込みに共役した活性(*pac*-ATPase活性)と、非共役型の活性(*nonpac*-ATPase活性)に分けられる。各変異gp19を含む精製系について、それぞれの活性を測定し、比較した(表6)。DNA詰込み活性を失ったgp19-G61D、gp19-H344Dは、*nonpac*-ATPase活性はあまり変異による影響を受けず、*pac*-ATPase活性を特異的に失っていた。gp19-G429Rは粗、精製系においてともに詰込み活性がgp19-wtの約1/5と低かったにもかかわらず、*pac*-ATPase活性はgp19-wtの約1.4倍であった。同位置変異体であるgp19-G429Lは、精製系における詰込み活性はgp19-wtと同程度であったが、*pac*-ATPase活性はgp19-G429R同様に高かった。精製系において詰込み活性を示したその他の変異gp19は*pac*-及び*nonpac*-ATPaseの両活性についてgp19-wtと同程度であったが、gp19-K370I、gp19-K430Tの*nonpac*-ATPase活性は、gp19-wtのその約2倍であった。

(H) まとめ

得られた結果を表7にまとめた。変異gp19は、その機能変化から次の4群に分類できる。

1：粗、精製系において共に詰込み活性を失ったもの（gp19-G61D、gp19-H344D）。

2：両系において詰込み活性が低下したもの（gp19-G429R）。

3：粗系においてのみ詰込み活性の低下しているもの（gp19-G63D、gp19-H347R、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-G424E）。

4：変異による影響をほとんど受けなかったもの（gp19-K64T、gp19-K370I、gp19-G429L、gp19-K430T、gp19-H553L）。

グループ1の変異gp19は、エンドヌクレアーゼ活性、トリプシンによる限定分解の結果から、変異導入によりgp19の立体構造が変化すると共に、ATPとの相互作用能を失っているといえる（図8、10）。従って、ATP存在下でもプロヘッドに過剰に結合し、この複合体は詰込み活性を持たず、結果としてpac-ATPase活性や詰込みに共役した特異的DNA切断活性を示さなかったと考えられる（図9、11、表5、6）。gp19-wtのエンドヌクレアーゼ活性はATPの他、gp18によっても抑制される（Fujisawa *et al.*, 1990）。一方gp19-G61Dのエンドヌクレアーゼ活性はATPによる抑制は受けないが、gp18によって抑制される（Kimura and Fujisawa, 1991）。つまり、これらの変異が引き起こす立体構造の変化は、ATPとの相互作用に特異的な影響を及ぼすが、エンドヌクレアーゼ活性やそのgp18による抑制には影響しないので、G61及びH344はATPとの相互作用に重要な役割を持つかもしれない。

グループ2のgp19-G429Rは、DNA詰込み活性が低いにもかかわらず、pac-ATPase活性がgp19-wtより高い（表5、6）。計算上、同量のDNAを詰め込むのにgp19-wtの8倍以上のATPを消費している事になる。また、同位置変異体のgp19-G429Lも粗系での詰込み活性が低く、かつ精製系のpac-ATPase活性がgp19-wtより高かった。これらの事実から、G429はATP加水分解とDNA移送との共役に関わる可能性が示唆される。

グループ3の変異gp19は、粗系でのみ詰込み活性を失っていた（表5）。粗系と精製系との相違点は、コンカテマーからのDNA切出しを伴うか否かにある。gp19-H347Rを除くこのグループの全ての変異gp19は、gp19が単独で示す非特異的エンドヌクレアーゼ活性とDNA詰込みに伴う特異的DNA切断活性を共に失っていた（図8、9）。両方のDNA切断活性が、1アミノ酸置換により同時に失われるという事実は、非特異的エンドヌクレアーゼ活性とTR配列特異的DNA切断活性は同一の機能ドメインに担われることを示している。gp19単独では非特異的なDNA切断活性が、詰込み機構に組み込まれると、配列

特異的なそれに変化すると考えられる。配列特異的DNA切断には1：配列認識、2：DNAへの結合、3：DNA切断の少なくとも3つの活性が必要とされる。gp19-G63D、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-G424Eはいずれも、TR配列切断活性を失っていたが、TR配列左端を認識し、そこで詰込みを停止していた（図9）。つまり、これらの変異gp19は1と2の活性は保持していると考えられる。ATP (Mg^{2+}) 結合共通配列に導入した変異がDNA切断活性に影響を及ぼしたことは、これらの領域がDNA切断活性と何らかの関係を持つことを示唆する。このことは、非特異的なエンドヌクレアーゼ活性がATPによる制御を受ける事からも支持される。この表現型を示す変異は、3つのATP結合共通配列全てに見られるので（表7）、これらの領域は立体構造中で近傍に位置し、一つの機能領域を構成するか、あるいは複数の領域がDNA切断に関与しているのであろう。精製系でのTR配列左端切断は、コンカテマープロセシングの終結切断に相当するが、gp19-G63D、gp19-G367D、gp19-G369D、gp19-G424Eの粗系における詰込み活性の喪失が、コンカテマープロセシングの開始切断の異常によるものか、あるいは終結切断の喪失によるものか、あるいはその両方なのかは現段階では不明である。

第3のグループの例外的存在であるgp19-H347Rは、非特異的なエンドヌクレアーゼ活性、精製系における終結切断に関してはgp19-wtと同様の挙動を示した（図8、9）。上述のように、粗系においては開始切断が必須となるので、gp19-H347Rは、開始切断に異常がある可能性が高い。今回、少なくとも終結切断はgp19が直接関係することが示されたが、開始切断が終結切断と同じ機構によるものかどうかは未だ判らない。開始切断には終結切断とは異なるDNA上の認識配列が必要とされ、詰込み機構以外にもRNAポリメラーゼなど様々な因子が関与することが知られている（Hashimoto and Fujisawa, 1992a,b）。近縁なT7ファージでは、RNAポリメラーゼの変異のサプレッサー変異が遺伝子19に現れることが示されており、RNAポリメラーゼとgp19との間に何らかの相互作用があることが示唆されている（Studier, 私信）。gp19-H347Rは、開始切断に必要な他因子との相互作用能を失ったために、粗系でのみ詰込み活性を示さなかったのかもしれない。あるいは、開始切断と終結切断にはそれぞれ別の活性中心（あるいは別の機構）があり、gp19-H347Rは開始切断にのみ関与するDNA切断能を喪失したのかもしれない。コンカテマープロセシングを研究する上で、このgp19-H347Rを用いることにより新たな知見が得られるかもしれない。

第4のグループの変異gp19には、gp19-wtとの間に顕著な差は見られなかった（表7）。

ATP結合にはリジン残基が重要であることが、種々のATP結合蛋白質で知られている (Fry *et al.*, 1986; Maruyama and MacLennan, 1988; Hinz and Kirley, 1990)。しかし、転写終結因子 ρ については、ATP結合領域のリジン残基を置換してもATPase活性に影響はないという報告もある (Dombroski *et al.*, 1988)。gp19-K370I、gp19-K430Tに関しても、*nonpac*-ATPase活性が高いこと以外は、gp19-wtとほぼ同じ活性を示したので、リジン残基はあまり重要でないのかもしれない (表6)。ただし、gp19-wtの示す*nonpac*-ATPase活性の実態が不明なので、gp19-K370I、gp19-K430Tにおけるこの活性の上昇がどのような意味を持つのかは今後の課題である。gp19-H553Lもこのグループに属する。T7はT3に非常に近縁で、gp19のアミノ酸配列においても高い相同性が見られ、ATP結合共通配列I、II、及びMg²⁺結合共通配列Iは、両フェージにおいて保存されている。しかし、このH553の位置するMg²⁺結合共通配列IIはT7には存在しないので、この領域はMg²⁺結合に関与しない可能性が高い。

2 ATPによるgp19の構造変換の解析

(A) トリプシン及びサーモリシンによるgp19の限定分解

上述したように、gp19-wtをトリプシン等のプロテアーゼで限定分解すると、一定の分解パターンが得られる。ATP存在下ではこの分解パターンは変化し、プロテアーゼに対する抵抗性が増す。このように、gp19のプロテアーゼ感受性は、ATPとの相互作用により変化することから、gp19はATPと結合することにより構造変換を行うことが予想される。この構造変換の実態を把握するために、プロテアーゼによる切断部位を特定することを試みた。

図12に示したように、サーモリシン、トリプシンによるgp19の分解パターンは、ATPの添加により大きく異なる。サーモリシンを用いた場合、分子量66.7kDaのgp19から、ATP非存在下では36.0kDa (Th fragment)、ATP存在下では59.6kDa (ThA I) 及び55.7kDa (ThA II) の主要断片が生じる。また、トリプシンを用いた場合は、ATP非存在下では37.5kDa (Tr)、ATP存在下では57.0kDa (TrA I) 及び49.2kDa (TrA II) の主要断片が生じる。

(B) 主要断片のN末アミノ酸配列決定

材料と方法で述べたように、各主要断片 (Th, ThA I, ThA II, Tr, TrA I, TrA II) を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、各断片の N 末端から 5 アミノ酸残基の配列を決定した。得られた配列を、DNA 塩基配列より予想される gp19 のアミノ酸配列と比較した (図 1 3)。Th 断片を含む電気泳動上のバンドは、実際には 3 種のペプチド断片の混合したものであった。アミノ酸組成と混合物のアミノ酸の量比から図 1 3 に示されるように、Th 断片の N 末端は非常に近傍に接した M288²¹, L289, L293 であると結論した。Tr 断片は、K280 と A281 の間で切断を受けて生じたものであった。ThA I と ThA II、TrA I と TrA II はそれぞれ分子量は異なるものの、ThA I と ThA II は S2、TrA I と TrA II は N8 と、同様の N 末端を持っていた。

Th, Tr, TrA I, TrA II の切断部位は、使用したプロテアーゼの基質特異性に合致していた。しかし、ThA I と ThA II の N 末端は S2 であるが、M-S 間のペプチド結合はサーモリシンの認識部位には属さない。Dunn and Studier (1983) によって予想されたように、大腸菌内で gp19 ポリペプチドの N 末端の M1 は除去されるのであろう。

サーモリシン及びトリプシンによる切断部位は、両プロテアーゼの基質特異性が異なるにもかかわらず、ATP 存在下、非存在下においてそれぞれ非常に近傍に位置していた。

(C) まとめ

図 1 3 に、各断片の C 末端をその分子量から概算して示してある。これによると、ATP 非存在下では、gp19 の C 末側の領域はプロテアーゼ抵抗性の構造を採り、一方 N 末端側の領域はプロテアーゼに感受性が高い。それとは逆に、ATP 存在下では gp19 の N 末端側のほとんどの領域がプロテアーゼ抵抗性を示すが、C 末端の約 100 アミノ酸残基からなる領域は、プロテアーゼに対して感受性となる。

これらの結果は、gp19 は次の 3 つの構造上のドメインからなることを示唆する：D1；ATP 非存在下においてプロテアーゼ感受性の N 末端領域 (N 末端 - 280 近傍)、D2；ATP の有無に関わらずプロテアーゼ抵抗性の“コア”領域 (280 近傍 - 500 近傍)、D3；ATP 存在下においてプロテアーゼ感受性の C 末端領域 (500 近傍 - C 末端)。

3 gp19 のプロヘッド結合領域の解析

(A) トリプシン断片のプロヘッド結合能

²¹ アミノ酸残基は 1 文字表記に N 末端からの番号を添えて表してある。

トリプシンによるgp19の限定分解により生じるペプチド断片について、ATP非存在下で得られるTr断片はC末側の約300アミノ酸残基からなり、またATP存在下で得られるTrA断片（主にTrAII断片を含む）はN末側の約500アミノ酸残基からなることが明らかになった。このような限定分解によって得られるペプチド断片は、gp19の機能を全てではなくても保持している可能性があり、従ってgp19の構造・機能相関の解析に有用である。

ATP存在下（TrAII断片を主に含む）、非存在下（Tr断片を主に含む）でトリプシン限定分解後、soybean trypsin inhibitorを加えて反応を停止させ、gp19を除いた精製系にこれら反応液を加え詰込み活性を調べたところ、両者とも精製系に比較して活性は低かった（図14）。この残存活性は、限定分解時にトリプシンによる分解を免れたgp19によるものと考えられる。Tr断片を主に含むATP非存在下でのトリプシン限定分解物を精製系に加えると、詰込み活性は競合的に低下した。一方、ATP存在下での限定分解物は、精製系の詰込み活性に影響を及ぼさなかった。前者の精製系に対する阻害効果は、DNA詰込みのどの過程に対して作用しているのだろうか。

gp19-プロヘッド複合体形成過程に対する影響を調べるために、soybean trypsin inhibitorで反応を停止させたATP非存在下での限定分解物を、ATP存在下あるいは非存在下でプロヘッドと反応させ、超遠心によりプロヘッド分画を分離し、これをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した（図15）。Tr断片はATPの有無に関わらずプロヘッドに過剰に結合していた。一方、TrA断片を含むATP存在下での限定分解物は、プロヘッド分画に確認出来なかった（データ省略）。抗gp19抗体を用いてウェスタンブロッティングを行っても、TrA断片は検出できなかったため、TrA断片はプロヘッド結合能を持たないと結論できる。従って、Tr断片によるDNA詰込み阻害はTr断片がgp19と競合してプロヘッドに結合し、これを不活化したと言える。これらの事実は、C末端側約300アミノ酸残基からなる領域、特にTrA断片には含まれないC末端の約100残基中に、プロヘッド結合に関与する領域が存在することを示す。

(B) Tr断片C末端の解析

A281をN末端にもつTr断片のC末端は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により得られた分子量から考えて、gp19のC末端（W586）が残っているか、あるいは分解を受けていてもC末端からそれほど遠くない位置にあると思われる。Tr断片はプロヘッド結合能を保持しており、プロヘッド結合領域を特定するためには、Tr断片のC末端を決定

することは重要である。そこで、anhydrotrypsin agaroseカラムを用いて、Tr断片のC末端が分解により生じたものかどうかを調べた。C末端にKもしくはR（トリプシンの認識部位）を持つペプチドは、anhydrotrypsin agaroseに吸着する。gp19のC末端アミノ酸はWであるので、仮にTr断片のC末端が分解を受けていないのならば、Tr断片はカラムを通過するはずである。トリプシン未処理のgp19は同条件でこのカラムには吸着されない（データ省略）。Tr断片を含むgp19のトリプシン分解物にDIFPを加えて反応を停止させ、anhydrotrypsin agaroseカラムを通過させた。Tr断片はカラムに吸着し、5mM HClによって溶出された（図16A）。したがって、Tr断片のC末端はKあるいはRである。図16Bに示すように、C末端領域に存在するKあるいはR残基は、まずR582、次がK537である。A281からK537、あるいはR582までのペプチド断片の分子量は、それぞれ29.3kDaあるいは34.4kDaと計算される。Tr断片の分子量はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による概算では37.5 kDなので、Tr断片のC末端はR582であると考えられる。

(C) C末端欠損変異gp19の作製及びその機能解析

Tr断片は、M1-K280およびF583-W586の領域を欠いていたにもかかわらず、プロヘッド結合能を保持していた。プロヘッド結合領域をより限定するために、数塩基の置換により終始コドンが現れるような変異遺伝子19を作製し（表4）、変異部位は最終的にはDNA塩基配列決定を行ない確認した。部位特異的変異gp19と同じ方法で、大腸菌内で大量発現を行い、これを精製した。変異蛋白質gp19 Δ C10はC末端の10アミノ酸残基を、gp19 Δ C15は15アミノ酸残基を欠失している（図17）。

得られたgp19のC末端欠失を確認し、かつATPとの相互作用能を調べるために、トリプシンによる限定分解を行った（図18）。ATP非存在下で得られるTr断片の分子量は、gp19-wtでは37.5kDaであるのに対して、gp19 Δ C10、gp19 Δ C15ではそれぞれ36.0kDa、36.5kDaでありC末領域の欠失が確認出来た。また、両変異gp19ともATPの有無による分解パターンはgp19-wtのそれに酷似していた。このことから、これらの変異gp19のグローバルな構造及びATPによる構造変換はgp19-wtと同様であると結論できる。

これらのC末端欠失変異gp19の精製系における詰込み活性を測定したところ、gp19 Δ C10はgp19-wtの1/10ではあったが有意な活性を示した。一方gp19 Δ C15は精製系における詰込み活性を失っていた（図17）。gp19 Δ C15の活性喪失の原因を調べる目的で、プロヘッド結合能を調べた（図19）。gp19-wtはプロヘッド1分子に対して、ATP存在

下で約6分子、非存在下で20分子以上結合した (Fujisawa *et al.*, 1991)。一方、gp19 Δ C15ではATPの有無に関わらず、プロヘッド分画にgp19は検出されなかった。抗gp19抗体を用いたウェスタンブロッティングを行っても、やはりgp19は検出されなかった (データ省略)。しかしながら、gp19 Δ C15-プロヘッド複合体が非常に不安定なため、超遠心による複合体分離段階で解離したという可能性が残る。そこで、gp19-wtとgp19 Δ C15間での精製系における競合実験を行った。gp19-wtの40倍以上のgp19 Δ C15を加えても、gp19-wtの精製系における詰込み活性は影響を受けなかった (図20)。gp19-wtをATP非存在下でプロヘッドと前反応 (反応1) させ、これをプロヘッドを除いた精製系に加え詰込み反応を行なわせると (反応2)、gp19-wtがプロヘッドに過剰に結合してこれを不活化する事が判っている (Fujisawa *et al.*, 1991)。実際に図21に示すように、gp19-wtについては反応1に加えたgp19-wt濃度が上昇するに伴って詰込み活性は減少する。しかしながら、gp19 Δ C15はATP非存在下で反応1を行わせても反応2での詰込み活性を全く阻害しなかった (図21)。これらの結果は、gp19 Δ C15の詰込み活性喪失はプロヘッド結合能の喪失に起因することを示している。

gp19 Δ C10は、精製系標準反応液においてgp19-wtの1/10程度の活性を示した (図17)。精製系におけるgp19 Δ C10の濃度を変化させて系の詰込み活性を測定すると、高濃度 (0.65 μ M) のgp19 Δ C10を含む精製系はより高い詰込み活性 (gp19-wtの約1/2) を示した (図22A)。実際に頭殻内に詰め込まれたDNA量をアガロースゲル電気泳動により測定すると、感染性粒子として測定された値と相関が見られた (図22B)。gp19 Δ C10は精製系におけるDNA詰込み活性に関して、gp19-wtよりもgp19蛋白質濃度への依存性が高いのであろう。また、精製系のプロヘッドの濃度を1/10に下げ (2×10^9 peq) 同様の実験を行うと、その傾向はより顕著になった。従って、gp19 Δ C10はプロヘッドとの親和性が低下しているために、精製系の詰込み活性に関してgp19蛋白質濃度依存性が増加していると考えられる。gp19 Δ C10のプロヘッド結合能を調べたところ、ATP非存在下でのプロヘッド結合はgp19-wtと同様に起こるが、ATP存在下ではプロヘッド分画においてgp19 Δ C10は非常に少量かあるいは検出されなかった (図19)。おそらく、ATP存在下でのgp19 Δ C10-プロヘッド複合体は、gp19-wtの場合よりも不安定なため、超遠心による複合体分離時に解離してしまったと考えられる。これらの事実は、C末端の10アミノ酸残基は、gp19のプロヘッドへの親和性に重要であることを示唆する。しかし、gp19 Δ C10は精製系において十分な活性を示すことから、C末端の10アミノ酸残基を欠失してい

も、gp18-DNA複合体との会合や頭殻内へのDNA移送等の反応を進行することができることが判った。

(D) プロヘッド結合に関与する領域(領域I)のアミノ酸配列を持つ合成ヘキサペプチドの詰込み活性への影響

gp19 Δ C10は詰込み活性を持つ一方、gp19 Δ C15はプロヘッド結合能を失ったために詰込み活性を示さなかった。このことから、C末端から10~15番目のアミノ酸配列(Y572-D576)がプロヘッド結合に重要な領域であることが示唆される。興味深いことに、この領域を含むL571-D576(領域I)は、 λ ファージで遺伝学的な解析からプロヘッド結合に関与すると推測されている領域(LSGEDE)と非常に類似している(Sippy and Feiss, 1992)。また近縁なT7ファージにおいても領域Iは保存されており、領域Iのアミノ酸配列は他のファージにおいてもプロヘッド結合に関与する可能性が高い(図2.3)。蛋白質間の相互作用に関与する領域が比較的狭い領域に限定される場合、その領域のアミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドは、その配列の役割を解析する上で有用である(Pierschbacher and Rouslahti, 1984; Eto *et al.*, 1991)。gp19のプロヘッド結合における領域Iの重要性を詳しく調べるために、領域Iのアミノ酸配列をもつヘキサペプチド(6pT3; LYWEDD)を合成し、精製系のDNA詰込み活性に対する影響を調べた(図2.4)。プロヘッドを各濃度の6pT3で25℃ 10分間前処理し、その後プロヘッドを除いた精製系中で詰込み反応を行わせた。精製系の詰込み活性は、6pT3の濃度に依存して減少した。

(E) ヘキサペプチドを用いたプロヘッド結合領域の解析

6pT3はDNA詰込みに対して阻害効果をもつが、この阻害効果は精製系における詰込み反応のどの素過程に対するものなのか。そこで、表8に示すように、詰込み反応を2つの副反応、即ちgp19-プロヘッド複合体形成過程(第一反応)と50S複合体形成からDNA移送までの過程(第二反応)に分離し、各過程に対する6pT3の阻害効果を調べた。5 mM 6pT3を第一反応前半(表8、gp19-wtexp. 3)あるいは第一反応後半(表8、gp19-wtexp. 2)に加えて反応を行い、それぞれにgp18-DNA複合体を加えて第二反応を完了させた後、DNA詰込み活性を感染性粒子として測定した。gp19-プロヘッド複合体形成後に6pT3を加えた場合、DNA詰込み活性はあまり影響を受けなかった(表8、gp19-wtexp. 1及び2)。これとは逆に、プロヘッドを6pT3で前処理すると、DNA詰込み活性は大きく減少した(表8、gp19-wtexp. 1及び3)。この結果は、6pT3の詰込み阻害効果はgp19-プロヘッド複合

体形成過程に作用するものであり、その後の反応素過程（50 S 複合体形成、DNA移送、尾部及び尾部繊維集合）の阻害によるものではないことを示している。

6pT3のgp19-プロヘッド複合体形成過程に対する阻害効果をより詳細に調べるために、第一反応終了後、反応液をcomplete pac buffer で1/100に希釈し第二反応を行った（表9）。各反応を6pT3存在下、非存在下で行ったものを、様々に組み合わせて実験を行った。第一、第二反応を通して6pT3を共存させた場合（表3、gp19-wtexp. 4）については、希釈液中にも6pT3を共存させた。gp19-wtは、第一反応を6pT3の非存在下で行った場合、第二反応を6pT3存在下で行ってもDNA詰込み活性はあまり影響を受けなかった（表9、gp19-wtexp. 1及び2）。この結果は、表8のgp19-wtexp. 1及び2で示した結果と一致しており、6pT3はgp19-プロヘッド複合体形成後の諸過程を阻害しないことを示す。第一、第二反応共に6pT3存在下で行った場合、DNA詰込みは顕著に阻害される（表9、gp19-wtexp. 1及び4）。しかしながら、第一反応を6pT3存在下で行っても、第二反応に6pT3が存在しない場合、DNA詰込み活性はあまり減少しなかった（表9、gp19-wtexp. 1及び3）。これは、6pT3のgp19-プロヘッド複合体形成に対する阻害効果が可逆的であることを示す。また特にデータを示さないが、gp19及びプロヘッドの濃度をそれぞれ標準反応液の1/100にしてDNA詰込み反応を行わせると、詰込み活性は1/10以下に減少した。しかし、表9、gp19-wtexp. 3で示した詰込み活性は、第二反応前に1/100希釈しているにもかかわらず対照（gp19-wtexp. 1）の1/2程度の減少にとどまった。このことから、gp19が6pT3の存在下においてもなおプロヘッドと結合し、その複合体は希釈による6pT3濃度の減少によりDNA詰込みの機能を回復したと考えられる。

gp19とプロヘッドは果たして6pT3存在下においても複合体を形成し得るだろうか。図19と同様の方法で、complete pac buffer 中でgp19とプロヘッドを6pT3存在下あるいは非存在下で反応させ、複合体を超速心により分離した（図25）。その結果、6pT3存在下で反応させた場合でも、対照とほぼ同じgp19量がプロヘッドに結合していることが判った。従って、6pT3存在下でもgp19とプロヘッドの結合は可能であると結論できる。6pT3が示した精製系におけるDNA詰込み活性の阻害効果は、gp19-プロヘッド複合体形成過程に作用するものであったが（表8）、この阻害はgp19とプロヘッドとの物理的な結合そのものの阻害ではなく（表9、図25）、DNA詰込みにおけるgp19-プロヘッド間の機能的相互作用に対する阻害であると思われる。

C末端の10アミノ酸残基（領域II）を欠くgp19ΔC10は、精製系におけるDNA詰込み活

性を示したものの、上述したようにプロヘッドに対する親和性が低いと考えられる。領域IIの機能を調べるために、gp19 Δ C10のDNA詰込み活性に対する6pT3の影響を、gp19-wtの場合と同じ実験系を用いて調べた(図2 4及び表8及び9、gp19 Δ C10)。gp19 Δ C10を含む精製系への6pT3の阻害効果は、gp19-wtへのそれよりもかなり大きく、より低い濃度の6pT3によって詰込みが阻害された(図2 4)。DNA詰込み反応の各素過程への6pT3への影響を見ると、gp19-wtの場合と同様に、gp19 Δ C10-プロヘッド複合体形成後では6pT3の阻害効果はあまり見られないが(表8、gp19 Δ C10 exp. 1及び2)、複合体形成前に6pT3を加えた場合はDNA詰込みは非常に強く阻害された(表8、gp19 Δ C10 exp. 1及び3)。しかしながら、第一反応後に希釈を行う実験では、gp19-wtの場合と異なる結果が得られた(表9、gp19 Δ C10)。6pT3非存在下での第一反応後、6pT3存在下で第二反応を行わせると、gp19-wtとは違ってDNA詰込みは大きく阻害された(表9、gp19-wt exp. 1及び2； Δ C10 exp. 1及び2)。また、第一反応を6pT3存在下で行い、第二反応は6pT3非存在下行った場合、gp19-wtと異なりかなりの詰込み阻害が見られた(表9、gp19-wt exp. 1及び3； Δ C10 exp. 1及び3)。全体的に見て、6pT3のDNA詰込みに対する阻害効果は、gp19-wtよりもgp19 Δ C10に対して遥かに強く現れた。

gp19-wtとgp19 Δ C10への6pT3の阻害効果の差は、何に起因するものなのだろうか。プロヘッドとgp19-wtあるいはgp19 Δ C10との間の相互作用に対する6pT3の影響を調べるために、6pT3存在下、非存在下で精製系における成熟型頭部の形成を時間を追って測定した(図2 6)。gp19を除いた精製系を6pT3存在下あるいは非存在下で25℃ 10分間前処理した後、gp19-wtまたはgp19 Δ C10を加えて各時間反応させ、感染性粒子としてDNA詰込み活性を測定した。gp19-wtを含む6pT3非存在下の精製系では、DNA詰込み反応は20分で完了したが、6pT3存在下では反応完了までに30分を要した。しかしながら両者において、最終的な粒子形成数にほとんど差はなかった。gp19 Δ C10を含む6pT3非存在下の精製系では、gp19-wtの同じ場合と比較して、詰込み反応の完了がやや遅かった。しかし、6pT3存在下ではgp19-wtの場合と大きく異なり、成熟頭部の形成は長時間反応させた後でもほとんど見られなかった。これらの結果は、6pT3のgp19-プロヘッド相互作用への阻害効果は、gp19-wtでは可逆的であるが、gp19 Δ C10に対しては不可逆的であることを示している。

(F) アミノ酸置換ヘキサペプチドを用いた領域Iの解析

T3gp19の領域Iのアミノ酸配列と似た配列が、T7gp19の相当領域や λ gpAのC末端部に

も存在する（図23）。この領域Iのアミノ酸配列の重要性を確かめるために、アミノ酸置換ヘキサペプチドを用い、図24と同じ実験を行った（図27）。実験に用いたアミノ酸置換ヘキサペプチドは以下のとおりである：6pλ（LSGEDE）、λ gpAのC末端の6アミノ酸と同じ配列を持つ；6p1V（VYWEDD）、6pT3のLをT7タイプのVで置換した；6p6K（LYWEDK）、電荷を変えるために末端のDをKで置換した。6p6KはDNA詰込み活性に対して全く影響を及ぼさなかった。このことは、6pT3の持つ阻害効果にD576の負電荷が重要であることを示している。また、6pT3で見られたDNA詰込みへの阻害効果が低分子ペプチドの添加による非特異的な影響ではなく、LYWEDDという配列を持つ6pT3に特異的な影響であることをも示している。6pλはDNA詰込みを阻害したが、その阻害効果は6pT3のそれよりもかなり低かった。また、6p1Vの阻害効果は6pT3のそれとほぼ同程度であった。これらのことから、L571はT7タイプのVによって置き換えることができ、ヘキサペプチドの阻害効果に重要なのはペプチドの負電荷であると考えられる。

(G) まとめ

gp19の限定分解により生じたペプチド断片を用いた機能解析の結果、プロヘッド結合領域は、C末端側の約100残基内に存在することが明らかになった（図14、15）。また、この断片のC末端を調べた結果は、C末端4アミノ酸残基はプロヘッド結合に特に必要でないことを明らかにした（図16）。更に、gp19のC末端欠失変異蛋白質を作製し解析した結果、プロヘッド結合に重要な役割をもつ領域は、L571-D576の6アミノ酸残基という非常に限られた範囲であることがわかった（図17、19、20、21）。この6アミノ酸残基を領域I、C末端の10アミノ酸残基を領域IIとして、それぞれの機能を領域Iのアミノ酸配列を持つ6pT3を用いて詳細な解析を行った（図23、24）。上述のように、6pT3はDNA詰込み反応の素過程のうち、gp19-プロヘッド複合体形成を阻害する。またこの阻害効果には、D576の負電荷が重要であることが示された（図27）。希釈実験及び6pT3存在下でのgp19-プロヘッド複合体形成の確認から、6pT3はgp19とプロヘッドの物理的結合を阻害するものではなかった（表8、図25）。希釈実験では、希釈中及び後も同濃度の6pT3が存在すれば、詰込み阻害効果は保たれたが、希釈により反応液中の6pT3濃度が1/100に低下するとその阻害効果を失った（表9）。また図26に示したように、精製系で長時間の反応を行うと、6pT3の詰込み阻害効果は徐々に低下していった。これらの結果から、gp19-wtに対する6pT3の阻害効果は可逆的なものであり、長時間反応

あるいは希釈による6pT3濃度の低下により、6pT3はgp19の領域Iとの競合によりgp19-プロヘッド複合体から解離し、複合体はDNA詰込み活性を回復するのであろう。従って、6pT3の詰込み阻害効果は、gp19-プロヘッド間の結合阻害ではなく、両者の領域Iでの機能的相互作用を6pT3が特異的に阻害する事に起因すると考えられる。つまり、DNA詰込みにおいては、領域Iでのgp19-プロヘッド間の機能的相互作用が重要であると思われる。

領域IIを欠くgp19 Δ C10はgp19-wtより低いながらも有意なDNA詰込み活性を示したことから、詰込み反応中プロヘッドとの複合体形成及びそれ以降の反応を行い得ることは明らかである(図17)。しかし精製系においてgp19-wtよりもgp19濃度依存性が高いことが示され(図22)、ATP存在下でのgp19 Δ C10-プロヘッド複合体分離が出来なかった(図19)ことから、gp19 Δ C10はプロヘッドとの親和性が低く、gp19 Δ C10-プロヘッド複合体は不安定であると結論できる。6pT3のgp19 Δ C10に対する詰込み阻害効果が、gp19-wtに対するそれに比較して顕著に高いこともこの結論を支持する(図24)。6pT3を用いた希釈実験の結果は、gp19 Δ C10とgp19-wtとの差を浮き彫りにした(表9)。6pT3は、gp19 Δ C10-プロヘッド複合体形成後であってもDNA詰込みを阻害した(表9、 Δ C10 exp. 2)。この時、第二反応の反応液中の6pT3濃度はgp19 Δ C10やプロヘッドの濃度より遥かに高い。gp19 Δ C10-プロヘッド複合体は不安定なので希釈により解離し、6pT3により再結合を妨害されたのかもしれない。あるいは第一反応で形成されたgp19 Δ C10-プロヘッド複合体は高濃度の6pT3との競合により、解離もしくは不活化されたのかもしれない。いずれにしろ、これらの事実は領域IIがプロヘッドとの親和性あるいは複合体の安定化に重要な役割を持つことを示唆する。また図26に示したように、gp19-wtでは精製系における反応時間を長くすると、6pT3の阻害効果が低下し詰込み活性が回復したが、一方gp19 Δ C10では反応を長時間行わせても、6pT3存在下では成熟粒子の形成は見られなかった。この結果からも、gp19 Δ C10はプロヘッドとの相互作用において、6pT3との競合による影響を強く受け、DNA詰込みは不可逆的に阻害されることがわかる。

DNA詰込み反応は、二種の詰込み蛋白質の働きにより、前もって形成されたプロヘッドにDNAが詰め込まれる反応であり、ほとんどのファージにおいて共通の機構が存在すると考えられている (Murialdo and Becker, 1987; Earnshaw and Casjens, 1980)。一般に、詰込み蛋白質は大サブユニットと小サブユニットからなり、前者はプロヘッドに、後者はDNAに結合するという共通点がある ($\phi 29$; Guo *et al.*, 1987a; λ ; Becker *et al.*, 1977; T3; Shibata *et al.*, 1987a)。変異ファージや*in vitro* DNA詰込み系の解析から、いくつかのファージで小サブユニットはDNA詰込み反応に必須ではないが促進的に作用し、一方大サブユニットは必須である事が示されている (Black, 1989)。大サブユニットの分子レベルでの解析は、 λ ターミネースでコンカテマープロセッシングに関して行われている (Wu *et al.*, 1988; Frackman *et al.*, 1984, 1985) が、DNA移送装置の構成要素としての解析はほとんど行われていない。T3ファージでは、精製*in vitro* DNA詰込み系が確立されており、DNA詰込み反応に必要な因子、反応経路などが明らかにされている (Shibata *et al.*, 1987a)。本研究ではこの系を利用して、DNA詰込み反応における大サブユニットの役割を解析することによりDNA詰込み反応の分子機構の解明を試みた。

コンカテマープロセッシングと大サブユニット

コンカテマープロセッシングにおいて、特定の配列を認識してDNA切断を行うもの (T3, T7, λ , P2など)、あるいは非特異的な切断を行うもの (T1、T偶数系、P22など) がある。コンカテマープロセッシングはDNA詰込みと共役しており、配列特異性に関わらずDNA切断活性を担うのは、詰込み蛋白質であることが知られている (Black, 1989)。本研究において、T3ファージではこのDNA切断活性は大サブユニット gp19にあり、単独では非特異的な活性がDNA詰込み機構に組み込まれると特異的活性を示すよう変化することが示された (Morita *et al.*, 1994)。P2や λ ファージでもDNA切断活性は大サブユニットに存在することが遺伝学的に示唆されている (Bowden and Calendar, 1985; Davidson and Gold, 1992)。特に λ ファージでは、詰込み蛋白質はターミネースと呼ばれ、cos配列の切断について研究が進んでいる (Murialdo, 1991)。最近、精製した大サブユニット gpAは、単独でcos切断を行うことができることが*in vitro*で示された (Parris *et al.*, 1994; Rubinchick *et al.*, 1994)。しかしgpAのみで示すエンドヌクレアーゼ活性は正確度が低く、cos配列

内でのニック部位がずれるだけでなく、cos 配列 以外の部位での非特異的切断がみられた。この非特異的エンドヌクレアーゼ活性が、ATPあるいは小サブユニットgpNu1の添加によって抑制される点は、T3gp19と良く似ている (Rubinchick *et al.*, 1994)。ATPとエンドヌクレアーゼ活性中心を形成するアミノ酸残基との相互作用がターミネースのニックング特異性を増強し、gpNu1はcos配列への正確な結合により、正確なDNA切断を行えるようにgpAを配置していると説明されている (Rubinchick *et al.*, 1994)。ターミネースの場合、特異的なDNA切断はターミネースと宿主因子 (IHF) のみによって適当な条件下で *in vitro* で再現されるが、T3gp19の場合、特異的DNA切断はDNA詰め込みに共役して現れる (Fujisawa *et al.*, 1990)。ATPとの相互作用によるgp19の構造変換は、エンドヌクレアーゼ活性中心を分子表面からより内部へと移動させ、このgp19がプロヘッドと結合してDNA移送装置を構築した段階で、特異的DNA配列を切断するように配置もしくは構造変換を行うのかもしれない。また、gp18はDNAに結合し、DNA移送装置としてのgp19と相互作用することにより、エンドヌクレアーゼ活性に影響を及ぼすのかもしれない。gp18の機能に関しては、*in vitro* でDNA末端に結合することや (Fujisawa *et al.*, 1991)、感染菌からは二量体として精製されること (Hamada, 1987) が判っているが、DNA移送やDNA切断にどのように関わるのかは不明である。今後は、gp18についても詳しい解析がなされる必要があるだろう。

ATPase活性と大サブユニット

精製 *in vitro* 詰込み系の確立しているT3、 ϕ 29では、系の全ての因子 (2種の詰込み蛋白質、プロヘッド、DNA及びATP) が揃うと、ATPase活性が現れる事が示されている (Guo *et al.*, 1987b; Hamada *et al.*, 1987)。いずれも大サブユニットにATP結合共通配列が複数カ所存在することから、大サブユニットがDNA移送装置のATPase活性に関与すると考えられているが、直接的な証拠は得られていない。しかしながら、gp19-G429Rを用いて示されたように、少なくともDNA移送とATPaseの共役に、gp19が関係することが判った (Morita *et al.*, 1994)。

λ ターミネースは、プロヘッドを必要としないDNA依存性ATPase活性を示すことが知られている。しかしながら、このATPase活性は計算上DNA移送を行うには低すぎるので、このATPase活性はcos配列を開裂するヘリカーゼ活性に必要とされるものであると考えられている (Rubinchick *et al.*, 1994)。従って、 λ においてもDNA移送に必要とされる

ATPase活性は、プロヘッドと詰込み蛋白質がDNA移送装置を構築した際に、初めて発現するのであろう。DNA移送装置は、多種多様の蛋白質から構成され、複雑な四次構造を持ち、また多様な機能を発現する。DNA移送装置構築に伴って、構成要素である蛋白質間や蛋白質-DNA間の動的な相互作用が移送装置構造を変化させ、自身の機能調節を行う。例えば、gp19はATPとの相互作用によりプロヘッドへの結合が可能になり、またプロヘッドはgp19と移送装置を構築して初めてgp18-DNA複合体と詰込み前駆体を形成出来る。このような一定の秩序だった反応の積み重ねにより、ATP加水分解に駆動されるDNA移送（モーター）機能が発現するのだらう。

移送装置中のどの構成因子が、DNA詰込みに共役したATPase活性を担うのかは、今後の課題であり、これを明らかにすることによりDNA移送の駆動部及び移送反応についての理解が深まるであらう。

プロヘッド結合領域とその微細構造

gp19の限定分解により得られたペプチド断片や、C末端欠失変異gp19を用いた解析から、プロヘッド結合に関与する領域（C末端の15アミノ酸残基）が特定できた。また、合成ヘキサペプチドを用いた実験から、gp19のプロヘッド結合領域は、更に2つの機能領域（領域I、II）に分けられると結論した（図28）。通常、gp19は領域I及びIIの両方でプロヘッドに結合するのだらう。領域Iでのプロヘッドとの結合がDNA詰込みにおいて中心となる機能を担い、領域IIはgp19のプロヘッドへの結合を安定化し、領域Iでのプロヘッド結合を保証する楔的（アンカー）機能を担うと考えられる。DNA詰込みには、領域I-プロヘッド間の直接的相互作用が必須であり、6pT3はこの相互作用を妨害することにより、DNA詰込みを阻害するのだらう。gp19 Δ C10のDNA詰込み活性から判るように、領域IIは本質的にはDNA詰込みに関して必須ではない。しかしながら、6pT3により領域I-プロヘッド相互作用が妨げられる場合には、領域IIにおけるgp19とプロヘッドの安定な結合が不可欠となる。gp19-wtは領域IIを介して安定に結合できるため、反応時間を長くすると6pT3を競合により複合体から追い出すことができ、その結果領域Iとプロヘッド間の直接的相互作用が可能となり、詰込み活性を回復する（図28）。一方gp19 Δ C10は、領域IIのアンカー機能を欠くので、6pT3存在下では領域I-プロヘッド間の相互作用が回復せず、DNA詰込み活性を失ってしまうと考えられる（図28）。

領域Iのアミノ酸配列の重要性を調べるために、アミノ酸置換ヘキサペプチドのDNA詰

込みへの影響を見た(図27)。λ gpAのプロヘッド結合に関与することが推測されているC末端6アミノ酸の配列は、T3gp19の領域Iの配列と類似している(図23)。しかしながら、その類似性の割には、6pλのDNA詰込みへの阻害効果はあまり高くなかった。大サブユニットとプロヘッドとの間の相互作用をこの6アミノ酸領域のみに限って考えることはできないが、なんらかのフェージ種特異性があるのかもしれない。実際、gp19を除いたT3の精製 *in vitro* 系にλターミネースを加えても、詰込み活性は見られない(Fujisawa, 未発表)。T7タイプのV571を持つ6p1Vは6pT3と同程度の阻害効果を示した。この結果は、T3の精製系においてT3gp19の代わりにT7gp19を加えても高いDNA詰込み活性が観察されたことと一致する(Fujisawa *et al.*, 1990)。

6p6Kの結果からD576の負電荷がgp19-プロヘッド相互作用に重要である可能性が示唆された。また、T3gp19・T7gp19、λ gpAに共通して、負電荷を持つ酸性アミノ酸残基が3つ連続している。一般に多くの球状蛋白質では、N、C末端部は可塑的構造を持ち、分子表面に露出し、三次構造あるいは四次構造を安定化する機能を持つといわれている(Thornton and Sibanda, 1983)。領域Iもまた末端部に位置しており、プロテアーゼを用いた限定分解の結果から、ATP存在下では領域Iを含むC末端約100アミノ酸残基がおそらく分子表面に露出していると思われる。また、λ gpAにおいてこの配列は正に末端部に位置している。そこで他のフェージの大サブユニットについて、末端領域に酸性アミノ酸残基のパッチが存在するかどうか検索を行った(図29)。大サブユニットのアミノ酸配列が明らかにされているフェージは、大腸菌フェージのT3、T4、T7、λ、λ近縁の21、P1、P2、枯草菌フェージのφ29、サルモネラ菌フェージのP22で、このうちC末端領域に位置する3連続酸性アミノ酸パッチは、T3、T7、λのほか、21、P1に見られた(図29)。φ29はT3と同様、精製 *in vitro* DNA詰込み系が開発されており、DNA詰込み機構について分子レベルでの解析が進んでいる(Guo *et al.*, 1986)。φ29の大サブユニットgp16には、酸性アミノ酸パッチは存在しなかった。φ29はその詰込み機構において次のような点で他のフェージと大きく異なる。ゲノム末端に詰込み蛋白質小サブユニットが共有結合してDNA詰込みに機能し(Bjornsti *et al.*, 1983)、DNA複製はコンカテマー形成を経ずにプロテインプライミング機構により進行する(Salas, 1991)。また、詰込み機構の構成因子としてフェージ由来の特異的低分子量RNAを必要とする(Guo *et al.*, 1987c)。従って、φ29では大サブユニットとプロヘッドの相互作用の機構が、T3などのフェージとは大きく異なる可能性が高い。

λ と21は近縁ファージであるが、 λ gpAと21gp2のC末端6アミノ酸残基は類似性に乏しい (Frackmann *et al.*, 1985)。キメラファージの解析から、gpAの最後の5アミノ酸をgp2のそれで置換すると、 λ ファージの産生が著しく減少することが明らかにされている (Yeo and Feiss, 1995a)。このキメラ変異を抑制する復帰突然変異について調べると、終止コドンに変異が生じ、結果としてC末に更にEDEという3つの酸性アミノ酸が付加していた (Yeo and Feiss, 1995a)。このことは、C末端に存在する酸性アミノ酸パッチがDNA詰込みに（おそらくはプロヘッドとの相互作用に）重要であることを示唆している。21gp2にはC末端に酸性アミノ酸は存在しない。しかしながら、616-618に3つの酸性アミノ酸からなるパッチが存在し、これは λ gpAの617-619にも見られる。 λ や21では、C末端のパッチに加えて、これらのややC末端の上流に位置する酸性アミノ酸パッチもまたプロヘッドとの相互作用において何らかの役割をもつ可能性もある。

P1のgppacBではC末端の6アミノ酸配列はT3gp19の領域Iと非常に良く似ており、より上流には、9個の酸性アミノ酸からなるパッチが見られる。P22のgp2は、C末領域が正電荷を持つ塩基性アミノ酸に富み、N末領域は逆に酸性アミノ酸に富んでいる (Eppler, *et al.*, 1991)。P1、P22の大サブユニットについては分子レベルでの研究はほとんど行われていないが、このような電荷を帯びる末端領域は大サブユニットの何らかの機能を担っていることが期待される。また、特に配列をあげないが、T4gp17、P22gp2においてはより中央部（末端領域ではなく）に領域Iに類似した配列が存在していることを記しておく。これらの領域の担う機能を更に研究することにより、DNA詰込みにおける大サブユニットの役割を解明していけるかもしれない。

T3gp19の機能領域と構造変換

gp19はATPと結合することにより、プロテアーゼ感受性が変化する (Fujisawa *et al.*, 1991)。この変化は、ATPにより誘発されるgp19の構造変換の結果によるものであることを明らかにした (図13、Morita *et al.*, 1995)。図30にまとめてあるように、gp19には3つの構造上のドメイン (D1, D2, D3) が存在すると考えられる。D1を欠くTr断片はプロヘッドに結合するものの、その結合様式はATPの有無に関わらず、ATP非存在下でのgp19-wtと同様に、プロヘッドに過剰に結合するというものであった (図15、Morita *et al.*, 1995)。ATP結合共通配列IIに変異を導入したgp19-G61Dは、立体構造が変化すると共にATPとの相互作用能を喪失しており、結果としてプロヘッドへの結合様式はATP非存在下

でのgp19-wtと同じであった(図11、Morita *et al.*, 1994)。L5-F24を欠くgp19- Δ Nもまた、プロヘッド結合様式はATPの存在に関わらずgp19-G61Dと同様であった(未提出データ)。gp19- Δ Nもgp19-G61Dと同様にATPとの相互作用能を失っているのであろう。D1に存在するATP結合共通配列IへのATPとの結合が、gp19の構造変換を引き起こし、D3を蛋白質分子の表面へ露出させるのかもしれない。一般に蛋白質の末端領域は分子表面に位置し、フレキシブルな構造をとるといわれている。Thornton and Shibanda (1983) は立体構造が明らかにされている蛋白質を調べ、多くの球状蛋白質において、その末端領域はドメイン間あるいはサブユニット間に位置し、高次構造を安定化させる役割を果たしていると結論した。ATP存在下において、プロヘッド結合領域を含むD3は分子表面でよりフレキシブルになり、DNA詰込みに機能し得るgp19-プロヘッド複合体を形成することが可能となるのだろう。ATP非存在下でも不活性型ではあるがD3を介してのプロヘッド結合は起こるが、このことは次のように説明できるだろう。ATP非存在下でのトリプシンによる分解では、K533からR582までの間に認識部位が存在しないため、Th断片のC末端は4アミノ酸残基を欠くにとどまり、プロヘッド結合領域(L571-C末端)近傍のプロテアーゼ感受性についての情報は得られなかった。一方、より基質特異性の低いサーモリシンによって得られるTh断片のN末端と分子量から、Th断片はC末端の10-30アミノ酸残基を分解により失っていると推論される。従って、gp19のプロヘッド結合領域はATP非存在下においてもおそらく、分子上でプロヘッドと相互作用しうる位置にあると考えられる。しかしながら、機能的なgp19-プロヘッド複合体(gp19/プロヘッド=6)形成には、ATP結合が引き起こすD1、D3を含むグローバルなgp19分子の構造変化により、プロヘッド結合領域が分子上に的確に配位される必要があるのだろう。ATP非存在下ではgp19はC末端を介してプロヘッドに結合し得るものの、結合領域の配位が的確でないため、この結合は不規則なものとなり(gp19/プロヘッド=20~30)、生じたgp19-プロヘッド複合体は活性を持たないと考えられる。

ATP結合共通配列は複数存在するので、gp19-プロヘッド複合体形成に関与するATP結合部位と、ATP加水分解に関与するATP結合部位は異なる可能性もある。今回明らかにされたATPによるgp19の構造変化は、プロヘッド結合に必要とされるものであり、DNA移送には直接関与しないのかもしれない。DNA移送とATP加水分解の共役に関係することが示唆されたG429は、ATP結合共通配列IIIにあり、これはD2に存在する。プロヘッドに結合した大サブユニットは更にその構造を変え、DNAや小サブユニットとの親和性が変

化することが示唆されている (T3; Fujisawa *et al.*, 1991; ϕ 29; Guo *et al.*, 1987a)。このようなDNA詰込み装置形成に伴うgp19の一連の構造変化により、D2が機能的構造を採り、詰込み装置全体としてのpac-ATPase活性が発現されるのかもしれない。

DNA移送モデル

gp19はプロヘッドに結合してDNA移送装置を構成する。遺伝子8の変異ファージの感染菌から精製した、コネクターを欠くプロヘッドにはgp19が結合しないことから、gp19はプロヘッド上にあるDNA入口構造であるコネクターに結合することが示された (Fujisawa *et al.*, 1991)。また、他のファージにおいてもDNA詰込み反応においてコネクターと詰込み蛋白質大サブユニットの相互作用が重要であることが、遺伝学的に示されている (T4; Hsiao and Black, 1977; λ ; Yeo and Feiss, 1995b)。ファージのコネクター蛋白質は、一次構造にホモロジーが無いにもかかわらず、共通して12量体として良く似たシリンドラ状の構造を作る (T4; Driedonks *et al.*, 1981; ϕ 29; Carrascosa *et al.*, 1985; λ ; Kochan *et al.*, 1984; T3; Carazo *et al.*, 1986)。T3では、コネクターの電子顕微鏡像のフーリエ法による画像解析から三次元構造が得られており、6回対称性を示すことが明らかにされている (Donate *et al.*, 1988; Valpuesta *et al.*, 1992)。gp19はATP存在下でプロヘッド1分子に対して、6分子結合することから、コネクターの6回対称構造の各ドメインに、1分子のgp19が結合すると考えられる。各gp19はC末領域を介してコネクターと結合し、DNA詰込み装置を構成する。DNA詰込み装置はATP存在下でDNA運搬体としてのgp18-DNA複合体との結合が可能となり、ATPase活性の発現によりDNA移送が開始する。

精製系では、DNAのmajor groove にグリコシルヒドロキシメチル基が突出しているT4DNAは詰め込まれるが、二重螺旋の周期を変化させるエチジウムブロマイドやアクチノマイシンDのようなインターカレート剤によってDNA詰込みは阻害される (Fujisawa, *et al.*, 1987)。従って、DNA詰込みにおいては、詰込み装置がDNAの規則的な螺旋構造を認識することが重要であると考えられる。

DNA移送反応の途中で、希釈によりATPの供給を絶つとDNA移送は停止するが、非加水分解性ATPアナログであるATP- γ -Sによりエネルギー供給を絶つと、頭殻内のDNAは飛び出してくる (Shibata *et al.*, 1987b)。つまりATP (ATP- γ -S) の存在下ではDNA移送装置とDNAとの相互作用が弱くなり、希釈あるいは加水分解によるATPの除去によりDNA移送装置の構造が変化し、DNAとの結合が一時的に強固になると考えられる。gp19

が(1)精製系における唯一のATP結合蛋白質であること、(2)ATPとの相互作用を介して構造変換を行うこと、(3)gp19の変異がDNA移送と*pac*-ATPaseの脱共役を引き起こすことから、DNA移送装置のATPを介した周期的構造変化はgp19を介して起こる可能性が高いと思われる。

以上のような知見を総合して、DNA移送装置としてのコネクター-gp19複合体における、ATPの結合、分解による除去に伴うgp19の周期的構造変換を介して、DNAを頭殻内へと移送するという、ラチェットモデルを提唱した(図3 1)。まず、コネクター上の、ATPを結合した6分子のgp19のうち1分子が、最寄りの二本鎖DNAの糖-リン酸バックボーンに結合する(図3 1 a)。DNA結合により誘発されるATPase活性によってATPが加水分解されると、gp19は構造変換を行いDNAを頭殻内へと手繰りよせる(図3 1 b)。ADPの解離につづいて再びATPと結合すると、DNAから解離すると共に元の構造に戻る(図3 1 c)。このときDNAの糖-リン酸バックボーンに、隣接するgp19が結合し、このサイクルが繰り返される(図3 1 c及びd)。6サイクル繰り返されると、6分子のATPが加水分解され、1ピッチのDNA螺旋が移送される。即ち理論上1分子のATPにより1.72bpが移送されることになる(10.3bp/6ATP)。この値は*pac*-ATPase活性の測定から算出された実験値

(1.8bp/ATP)に極めて近い。多くのヌクレオチド三リン酸の加水分解により駆動される、ミオシンやキネシンなどの生物機械の実態は、NTPを介した蛋白質(あるいは蛋白複合体)の秩序だった周期的構造変化により説明されている(Alberts and Miyake-Lys, 1992)。

我々のモデル以外に、コネクターを中心とするDNA移送装置モデルが提唱されている(図3 2)。(A)移送装置の持つトポイソメラーゼ活性により、ATPを消費しながらDNAに一時的な超螺旋を導入しつつDNAを手繰り寄せる(Black and Silverman, 1978)。(B)ATPエネルギーによりコネクターが回転し、コネクターの中心孔とDNAの溝が、ボルトとナットのように働き、DNAが移送される(Hendrix, 1978)。(C)DNAがコネクターの周囲に巻き付き、コネクターが回転することによりDNAを移送する(Turnquist *et al.*, 1992)。(A)はニックを持つDNAやソーラーレンで鎖間クロスリンクされたDNAが移送可能であることから否定される(Fujisawa *et al.*, 1987)。モデル(B)及び(C)は、頭殻の頂点(5回対称)とコネクター(6回対称)の回転対称性が異なることから、コネクターが頭殻上で回転できるという仮説(Hendrix, 1978)に基づいたものである。モデルCの根拠は、クローニングした遺伝子の大量発現により得られた精製コネクターに、DNAが巻き付くというものであるが、プロヘッド上のDNA移送装置としてのコネクターへの

DNAの巻き付きを確認していない。また、コネクターとプロヘッドの間にDNAが巻きつき得る空間があるとしたら、DNA移送中のDNA移送装置の安定性が疑問視される。またモデルB及びCは、詰込み蛋白質の関与を言及していないので、具体性に欠ける。しかし、DNA移送には規則的なDNA螺旋の外部構造が必要とされるという事実は、モデル(B)に一致する。

我々の提唱したラチェットモデルは、DNA詰込み蛋白質の関与を明確に言及した初めてのモデルであるが、モデルB同様、直接的証拠を得るに至っていない。DNA移送装置に組み込まれたgp19が、1 ; DNA移送中DNAと直接結合しているか、2 ; 構造変換を行っているか、3 ; *pac*-ATPase活性にどのように関与しているか、関与しているとする、そのATP結合はプロヘッド結合に必要とされるATP結合と異なるか否かは今後明らかにされるべき課題である。また、T3においても精製したコネクター蛋白質とDNAとは相互作用し得ることが判っている(Fujisawa, unpublished data)。移送装置におけるコネクターの役割について、1 ; コネクターは回転し得るのか、2 ; 精製されたコネクターとDNA間の相互作用と、移送装置に組み込まれたコネクターとDNA間の相互作用との関係、等を明らかにすることにより、DNA移送装置及び移送機構について重要な知見を得られるであろう。

結果及び考察

同調系を用いたDNA移送速度の測定

頭殻内に詰め込まれたDNAは高度に濃縮されており、DNA鎖間の平均距離は、T4で2.64nm、 ϕ 29、 λ 、T2、T7では2.73-2.75nmと計算されている (Stroud *et al.*, 1981; Earnshaw and Casjens, 1980)。これは結晶化されたDNAのそれとほぼ等しい (Earnshaw and Casjens, 1980)。従って頭殻内の圧力 (DNA圧) は、DNA鎖間の静電斥力もしくはDNA濃度により非常に高くなっていることが予想される。T3ファージの精製 *in vitro* 系におけるDNA詰込み反応は、ATPの代わりにATP- γ -Sを加えると50S複合体形成完了後停止し、ATPの添加によりDNA移送が同調的に開始する (Shibata *et al.*, 1987b)。Shibata *et al.* (1987b) は、DNA移送反応は20℃で約7分で完了し、従って平均移送速度は5.5kb/minと報告している。しかし、DNA移送の進行と共に頭殻内部のDNA圧は上昇するはずなので、DNA移送は一定速度で進行していない可能性がある。DNA移送により上昇するであろう頭殻内のDNA圧及び頭部拡大変換の移送速度に及ぼす影響を調べるには、より正確なDNA長の測定が必要とされる。Shibata *et al.* (1987b) が用いた電気泳動法は、20kb以上のDNAを正確に測定するには適当でないのでパルスフィールド電気泳動法の導入を試みた。本来この方法は数百kb-数Mbという染色体レベル長のDNAを解析するものである。そこでDNAマーカーとして、10-40kbの範囲は λ ファージのゲノムDNA (48.5kb) をApaI、NheI、KpnIで消化したもの (それぞれ38.4kb/10.1kb、34.7kb/13.8kb、29.9kb/17.1kb/1.5kbのDNA断片を生ずる) を、4-10kbの範囲は λ DNAをHind IIIで消化したものを用いて検討し、パルスフィールド法により30数kbのDNA長が正確に測定できることが判った (データ省略)。実際に同調実験を行い、移送開始後各時間の頭殻内DNA長を測定したところ、反応後1.0-3.0分の試料については図33Aに見られるようにDNAバンドはスミアになり、エチジウムブロマイド染色での観察は困難であった。このことから、ATP添加による移送反応開始が生物活性で見ると正確に同調していないことが判った。そこでT3DNAを酸-塩基処理により1kb前後に分断して³²P-dCTPで標識したものをプローブに用い、泳動後のゲルを酸-塩基処理した後、DNA断片をニトロセルロース膜に移し、Southern hybridizationを行っ

た(図3 3 B)。1-1.5分でのDNAバンドは一樣にスミアで、イメージアナライザーでバンドの放射能の強さを測定し、レーン毎にプロファイルをグラフとして描かせても、ピークは確認出来なかった。従って、確認できるスミアバンドの最長及び最短のDNA長を算出し、その平均をこの時点でのDNA長とした。2分以降は、はっきりとしたピークが確認できたため、エチジウムブロマイド染色から得られたデータと照合しながら、それぞれのDNA長を算出した(図3 3 C)。Shibata *et al.*(1987b)の得た数値と異なるのは同調系の組成もしくはDNA長測定法の違いによるものであろう。1分間当たりの移送DNA長で見ると、DNA移送開始2分までは9.88kb、11.8kbと増加傾向にある(図3 4 A)。しかし、1~2分を境にその後のDNA移送速度は減少した。図3 3 Cのグラフの近似曲線を計算し、これを微分して得たDNA移送速度が図3 4 Bに示してある。これによると速度の変曲点は2.04分であった。非常に興味深いことに、この値はプロヘッドの拡大変換が起こる時間に近い。0-2分のDNA移送平均速度は10.84kb/min、2-4分は5.81kb/min、4-6分では2.61kb/minと移送速度は頭殻にDNAが濃縮されるとともに減少した。2分までの増加傾向に関しては、詰込み開始時点でのATP- γ -Sの影響、実験精度(0.5-1.0分後のDNAバンドは非常にブロードである)などの理由から、意味のある増加なのか否かは判断できない。しかし、移送開始後2分を境に減少傾向へと移行することは明らかである。

Shibata *et al.* (1987b)によると、同調系においてATP添加後1分40秒に拡大した頭殻が現れ始める。著者の用いた組成の同調系で追試したところ、拡大頭部は1分30秒後に僅かに見られ、2分後にははっきりと確認出来た。おそらく、大部分のプロヘッドが拡大変換を引き起こすのは1.5~2分頃であると思われる。プロヘッドが拡大変換を引き起こす時期(約2分)と、DNA移送速度が減少へと転ずる時間(2.04分)とはほぼ一致している。拡大変換後は、それ以上頭殻体積は変化しないので、DNA移送が進行するとともにDNA圧が上昇し、DNA速度が低下するであろう。 λ ファージでは、ゲノム長の11.4%のDNA断片を詰め込ませた場合にはプロヘッドに変化はないが、44.5%の断片ではプロヘッドが拡大変換する(Hohn, 1983)。 ϕ 29ではゲノム長の34%の断片を詰め込んだ粒子は、成熟頭部に変化していた(Bjornst *et al.*, 1983)。今回得られたデータから、T3ではDNA移送開始後2分、即ち詰め込まれたDNA長が21.7kb(56.6%)に達すると拡大変換が誘発されることが明らかになった。

DNA詰込みに必要なDNA上のシグナル(pacシグナル)を組み込んだプラスミド(6kbp)を持つ大腸菌にT3ファージを感染させると、プラスミドDNAはコンカテマーになり、フ

フェージと同じ機構で詰め込まれ形質導入粒子を形成する (Hashimoto and Fujisawa, 1988)。頭殻内のプラスミドDNAは、主に6量体 (36kbp) であり、7量体 (49kbp) 以上のものは存在せず、5量体 (30kbp) 以下のものも少なかった。7量体が存在しないのはT3フェージの頭殻容量 (約40kbp) を越えているため物理的に詰め込めないことによる。5量体以下が少ないのは、ある程度頭殻がDNAで満たされなければDNA切断機構が働かないためだと考えられる (headful mechanism)。headful mechanismの実態はよく判っていないが、DNA移送速度を低下させると精製 *in vitro* 系での終結切断活性が高くなることが示されている (Fujisawa *et al.*, 1990)。本研究で、DNA移送速度は実際に頭殻内のDNA濃度が上昇するにしたがって低下することが示された。これらの事実から、DNA移送初期にpacシグナルが詰込み装置を通過しても、その速度が速いので認識できないが、ある程度 headful になると速度が低下し詰込み装置による認識が可能になるために、終結切断が起こると考えられる。他のフェージでコネクター蛋白質の1アミノ酸変異が詰め込むDNAのサイズを変化させることが知られており (P22: Casjens *et al.*, 1992; SPP1: Tavares *et al.*, 1992)、headful mechanism と移送装置の関連が強く示唆される。DNA移送に伴う頭殻内圧の変化が、DNA移送装置としての詰込み蛋白質-プロヘッド (コネクター) 複合体に作用して、DNA移送速度低下と協調してDNA切断を引き起こすのかもしれない。

同調系において、DNA移送途中にATP- γ -Sを添加すると、DNA移送は中断され、頭殻内のDNAはDNA鎖間の静電斥力によりプロヘッドから飛び出す。しかし、飛び出し後も常に一定長のDNAは頭殻内に残る。このDNA長をShibata *et al.* (1987) はT3DNAの約1/3長 (12.8kb) と計算しているが、これも今回パルスフィールド電気泳動法により再検討した。ATP添加2.5、3及び6分後にATP- γ -Sを加え、0℃ 5分後DNaseI処理をした。対照として、ATP- γ -Sを加えないで各時間後にDNaseI処理したものを用意した。2.5分後までは、ATP- γ -S添加試料と対照との間にDNA長の差は無かった。しかし、3分後の頭殻内のDNA長は28.9kbであったが、ATP- γ -Sを添加した試料では25.9kbと短かった (図3 5及び表10)。また、6分後にATP- γ -Sを添加した場合でも、3分後ATP- γ -S添加の試料で見られたDNAと同じ長さのバンドが確認出来た。これは、非同調的にDNA移送を開始し、6分後でも詰込みが完了していない中間体の頭殻内から、ATP- γ -S添加による影響を受けDNAが飛び出した結果と考えられる。頭殻内に残るDNA長は、ゲノム長の67.2%、25.9kbと算出された。これは、DNA移送中に頭部拡大変換が引き起こされる時点で、移送されたDNA長 (21.7kb) に近い値である。

T7、T4、P22ではプロヘッドの拡大変換に伴って、主要頭殻蛋白質分子の構造あるいは配置の変換が確認されている (Kistler *et al.*, 1978; Casjens, 1979; Wurtz *et al.*, 1976)。おそらくT3でもgp10の構造あるいはその配置の変換が起こっているであろう。Shibata *et al.* (1987b) は同調系を用いて、DNA移送開始後の移送中間体の塩に対する安定性を調べ、プロヘッド拡大変換が起こる時期に安定性が増すことを明らかにしている。Earnshaw and Casjens (1980) はプロヘッド拡大変換の機能的意味として、頭殻内壁とDNAとの相互作用の制御を挙げている。約22kbのDNA (移送開始後約2分) が頭殻内に詰め込まれた時に生ずるDNA圧がプロヘッドの構造変換を誘発し、その結果現れる頭殻内壁のDNA結合領域が、約26kbのDNAを頭殻内に安定に保持しているのかもしれない。

DNA移送速度変化、プロヘッド拡大変換、終結切断は、互いに密接に影響しあいながら現れる機能であり、DNA移送装置の構造にも深く関係しているだろう。また、DNA移送はATPエネルギーにより駆動されるが、DNA移送速度変化とATP消費との関係は非常に興味深い問題である。例えば、単位長DNA移送のためのATP消費が、移送開始時と終結時で変化しないとすれば、移送速度低下は頭殻内圧と移送駆動部との力平衡によると考えられる。あるいは、移送終結時は頭殻内圧上昇に逆らったDNA移送のために、開始時より多量のATPを必要とするかもしれない。この問題は、DNA移送のエネルギー論を考える上で非常に重要であろう。

材料と方法

1. バクテリオファージ

T3野生型株 (Luria株)

T3アンバー変異株 (括弧内に遺伝子番号及び機能を記す)

amNG20 (3, endonuclease)

amNG69 (5, DNA polymerase)

amNG220B (17.5, cell lysis)

amHM90 (19, DNA packaging protein large subunit)

多重変異株は、遺伝的組換えによって得られたものである。また、用いたアンバー変異株は全てamNG220Bとの多重変異体である。

M13mp19 (Yanish-Perron *et al.*, 1985)

2. 菌株及びプラスミド

Escherichia coli, strain B

BB (su^-)

ER22 (su^- , $endoI^-$)

E. coli, strain K

JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi1 Δ(lac-proAB)*, F' [*traD36 proAB+ lacI^q lacZΔM15*])

CJ236 (*dut1 ung1 thi1 relA1*; pCJ105(Cm^r))

pUC18 : (Yanish-Perron *et al.*, 1985)

pUCE1TR : T3DNAの遺伝子19及びその近傍領域 (E1配列) と、TR配列及びその近傍領域を同方向に持つpUC18。 (Yamada *et al.*, 1986)

pNT45 : Amp^r 及び λ ファージ P_L プロモーターを持ち、pNT203の制御下で、蛋白質の大量発現に用いられるベクター。

pNT203 : Tc^r 及び λ ファージ $cl857$ を持つ。

pKH2 : 遺伝子19を含む2.32kbpのT3DNA断片を組み込んだpNT45。gp19の発現ベクター。

M13-E1 : 遺伝子19を含む2.32kbpのT3DNA断片を組み込んだM13mp19。

3. 培地及びバッファー

M9A medium : 脱イオン水 1 l 当たり Na_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 3 g, NH_4Cl 1 g, glucose 2 g, Casamino acid 1 g, 1 mM MgSO_4 , 1 μM FeCl_3

PG medium : 脱イオン水 1 l 当たり peptone 10 g, NaCl 3 g, glucose 1 g (pH 7.4)

LB medium : 脱イオン水 1 l 当たり peptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g (pH 7.4)

M9-LB medium : M9AとLBを等量混合したもの。

寒天培地 : 示されている培地に1% agarを加えたもの。

pac buffer : 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 1 mM spermidine, 5 mM MgCl_2 , 7 mM 2-mercaptoethanol

complete pac buffer : 5% (w/v) polyethyleneglycol (#6000), 50 μM ATP, pac buffer

prohead buffer : 10 mM Tris HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 1 mM MgCl_2

PM buffer : 10 mM potassium phosphate (pH 7.4), 7 mM 2-mercaptoethanol

PMG buffer : 5% (v/v) glycerol, PM buffer

TMG buffer : 10 mM Tris HCl (pH 7.4), 7 mM 2-mercaptoethanol, 5% (v/v) glycerol

TBE buffer : 89 mM Trishydroxymethylaminomethane, 89 mM boric acid, 0.5 mM

EDTA

TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

20x SSC : 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate

50x Denhardt : 1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% bovine serum albumin

5x loading buffer : 20% sucrose, 0.1 M EDTA, 1% SDS, 0.01% BPB

4x sample buffer (SDS-PAGE) : 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% BPB

4. DNA詰込み反応に必要なファージ蛋白質及びDNAの調整

a. プロヘッド精製

Nakasu *et al.* (1985) の方法に従った。

b. gp18精製

Hamada *et al.* (1986a) の方法に従った。

c. gp19精製

Kimura and Fujisawa (1991) の方法を改変して行った。gp19を多量発現させた培養液2l分の細胞を集菌し、PM bufferで洗浄した。再集菌して菌容量の3倍の1 mM EDTA-PM bufferに懸濁し、-80°Cで凍結した。融解後、1 mg/mlとなるようリゾチームを加え、30分氷冷後終濃度 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂を加えてよく混合した。HITACHI RP40 ローターで2°C 36000rpm 2時間遠心した。上清を35%飽和 ammonium sulfate を加えて 0°C 1時間穏やかに攪拌し、SORVALL SS-34 ローターで2°C 12000rpm 20分間遠心した後、沈澱物を2 ml PMG buffer に懸濁し、PMG bufferに対して4°C一晩透析した。SORVALL SS-34 ローターで2°C 10000rpm 20分間遠心し、沈澱物を20 ml 0.5 M NaCl-TMG bufferに溶解した。これを0.1 M NaCl-TMG bufferに対して透析した後、再びSORVALL SS-34 ローターで2°C 10000rpm 20分間遠心し、上清をFPLCシステム (Pharmacia) により0.1 M - 0.5 M NaCl-TMG bufferの直線濃度勾配を作り、MonoQHR5/5 (Pharmacia) で分画した。gp19を含む分画に60%飽和ammonium sulfateを加えて0°C 1時間穏やかに攪拌し、SORVALL SS-34 ローターで2°C 12000rpm 20分間遠心した後、沈澱物を1 ml TMG buffer に溶解し、FPLCシステムを用いて、0.1 M NaCl-TMG bufferで平衡化したHi Load 16/10 (Pharmacia) で分画した。gp19を含む分画をPMG buffer (pH 6.8) に対して0°C 3時間透析し、ammonium sulfate溶液を終濃度 0.2 M になるよう加えた。BufferA (0.2 M ammonium sulfate -PMG buffer, pH 6.8)で平衡化したPhenyl Sepharose CL4B (Pharmacia) 20 mlに試料をのせた後、カラム容量の30% ethyleneglycol-BufferAで洗浄した。30 ml 30% ethyleneglycol-BufferA 及び 30 ml 70% ethyleneglycol-PMG buffer (pH 7.4)で濃度勾配を作り溶出した。gp19分画を0.1 M NaCl-TMG bufferに対して透析した後、MonoQを用いて濃縮し、これを60% glycerol-0.1 M NaCl-TMG bufferに対して透析し、-20°Cにて保存した。温度の指示がない限り、以上の操作は0-4°Cで行った。

d. head acceptor extract (H.A.E.) の調整

Shibata *et al.* (1987a)の方法に従った。

e. T3DNAの調整

CsCl平衡密度勾配遠心により精製したT3wtファージ粒子に0.2%SDS-50mMEDTAを加えて65℃ 10分間加熱し、粒子を破壊した。等量の水飽和Phenolで相分配した後、水相を分離し、TEbufferに対して透析した。

5. *in vitro* DNA詰込み反応系

a. 粗 *in vitro*系

Fujisawa *et al.* (1978)の方法による。3'・19'及び5'・19'のファージ感染菌抽出液を混合して、19'抽出液を作製した。これに 2×10^{11} peq (phage equivalent) 粒子型DNA、1.5 mM ATP、2 μ g gp19を加えて30 μ lとし、30℃ 60分間詰込み反応を行い、適当な希釈の後、指示菌 (BB) とともに37℃で数時間培養し、プラークを計数した。

b. 精製 *in vitro*系

Hamada *et al.* (1986b)の方法による。2 x 10¹⁰ peqプロヘッド、1 μ g gp18、0.1 μ g gp19、0.5 μ g DNAを含むcomplete pac buffer (20 μ l) を標準反応液とし、30℃ 30分間反応させた。その後DNaseIを加えて0℃ 20分間処理し、詰め込まれなかったDNAを消化した。生物活性を測定する場合には、5 μ lのH.A.E.を加えて30℃ 30分間反応させ、成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させて感染性粒子とした。これを適当に希釈し、指示菌 (BB) とともに37℃で数時間培養し、プラークを計数した。頭殻内に詰め込まれたDNAを観察する場合には、DNaseI処理後 5x loading bufferを加え、65℃ 10分間加熱した後、アガロースゲル電気泳動を行った。

6. 変異gp19の作製

Kunkel *et al.* (1987)の方法による。DNA上で期待される塩基置換がおこれば、制限酵素認識配列が現れるよう変異配列を考案し (表4)、Applied Biosystems社の380B-02型DNAシンセサイザー及び試薬を用いてオリゴヌクレオチドを合成した。

CJ236を宿主菌としてM13-E1の一本鎖DNAを調整し、これを鋳型、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして *in vitro* DNA合成を行った後、JM109へのトランスフェクションを行った。感染菌からRF-DNAを単離し、制限酵素で切断して変異体を選択した後、塩基配列を決定し変異の導入を確認した。得られた変異遺伝子-19をpNT45に挿入し、多量発現プラスミドを作製した。

変異gp19の精製は基本的に野生型gp19 (gp19-wt) と同様に行ったが、変異蛋白質gp19-G61D及びgp19-H344Dは菌体内で封入体を形成し、通常の方法による精製が困難であったため、上述の方法の一部を次のように改変して精製した。リゾチームによる溶菌後、終濃度1 M NaCl, 10 mM MgCl₂を加えてよく混合した。溶菌液を超音波処理し、SORVALL SS-34 ローターで2℃ 8000rpm 15分間遠心し、沈澱物を15 ml PMG bufferに懸濁した。再度超音波処理後、同様に遠心し、沈澱物を2 ml PMG bufferに懸濁し、これに18 mlの7 M guanidine-hydrochloride-20 mM phosphate buffer (pH 7.4)-1 mM DTTを加え、氷上で30分間処理した。その後、1 lの0.2 M NaCl - 1 mM MgCl₂ - PMG bufferに対して6時間透析し、さらに1 lの0.1 M NaCl - 1 mM MgCl₂ - PMG bufferに対して一晩透析した。遠心により凝集物を除き、上清をFPLCシステムにより0.1 M NaCl - 0.5 M NaCl の直線濃度勾配を作り、MonoQHR5/5で分画した。以下の手順はgp19-wtの場合と同じである。

7. gp19によるDNA切断反応

0.5 µg 環状pUC18と0.1 µg gp19を、complete pac buffer あるいはATPを除いたcomplete pac buffer 中で30℃ 30分間反応させた後、5x loading buffer を加えてアガロースゲル電気泳動を行った。

8. gp19-プロヘッド複合体の分離

プロヘッドとgp19をcomplete pac buffer あるいはATPを除いたcomplete pac buffer 中で30℃ 30分間反応させた。前者を50 µM ATPを含む20% sucrose - pac buffer (2.5 ml)、後者を20% sucrose - pac buffer に重層し、HITACHI RPS50-2 ローターで2℃ 3600rpm 2時間遠心し、沈澱物 (プロヘッド分画) を sample buffer に溶解した。試料をSDS ポリアクリルアミドゲル (12.5%) 電気泳動後、Coomassie blue R250 溶液で染色した。

9. ATPase活性測定法

100 μ M (α - 32 P) ATP (1.5 MBq/ml) を含む精製 *in vitro* DNA 詰込み反応液 (20 μ l) を 30°C 30 分間反応させ、2 μ l を polyethyleneimine 薄層 (Polygram CEL300PEI / UV₂₅₄, Macherey-Nagel 社) にスポットし、4°C で乾燥させる。薄層を methanol に 5 分間浸し、再び 4°C で乾燥させた後、1 M formic acid-0.5 M LiCl で展開した。ATP, ADP, AMP への放射能の分布は、イメージアナライザー (AMBIS Radioanalytic Imaging System) を用いて測定した。

10. プロテアーゼを用いた gp19 の限定分解

2.5 μ g の gp19 を、20 μ l の pac buffer 中で適当量のトリプシンもしくはサーモリシンで 20°C 一定時間処理した。ATP 存在下の処理は反応液中に 50 μ M ATP を加えた。反応を、4x sample buffer の添加、100°C 2 分間の加熱処理によって停止させ、SDS ポリアクリルアミドゲル (12.5%) 電気泳動を行った。精製 *in vitro* 系における限定分解物による詰込み阻害を調べる場合は、2 μ g の soybean trypsin inhibitor を加えることにより反応を止めた。

11. ペプチド断片の N 末端アミノ酸配列の同定

gp19 の限定分解により生じたペプチド断片を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、平野 (1988) の方法に従い、次のような手順で精製した。電気泳動 buffer に含まれている glycine を除去するため、ゲルを blotting buffer (25 mM Tris-Borate, 20% (v/v) methanol) で洗浄した。Trans Blot (Bio Rad) を用いて、ペプチド断片をゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore) に電気泳動的に移し、Ponceau S (Sigma) で染色された各ペプチド断片を含む膜上のバンドを切り出した。約 100 pmol の各ペプチド断片を用いて、自動化ガス相アミノ酸シーケンサー 477A (Applied Biosystems) により、N 末端より 5 アミノ酸残基を決定した。

12. 37.5 kDa ペプチド断片 (Tr) の C 末端の解析

125 μ g の gp19 を 1 ml の pac buffer 中で 25 μ g のトリプシンを用いて 20°C 30 分間処理後、終濃度 5 mM diisopropyl fluorophosphate (DIFP, Sigma) を加えて反応を停

止させた。反応液に0.3mlの1 M sodium acetate (pH 5.0) を加え、50 mM sodium acetate (pH 5.0) - 20 mM CaCl_2 - 5 mM DIFPで平衡化したanhydrotrypsin agarose (TAKARA) カラム (1ml) に上層した。同じbuffer 3 ml で溶出した (非吸着分画) 後、3 mlの5 mM HClで溶出 (吸着分画) した。両分画に含まれるペプチド断片は、アセトン沈澱後、sample bufferに溶解し、SDSポリアクリルアミドゲル (12.5%) 電気泳動を行った。

1 3. 合成ヘキサペプチドの調整

ヘキサペプチドの合成は自動化ペプチドシンセサイザー 431A (Applied Biosystems)によりFmoc固相法を用いて行った。trifluoroacetic acid 及びdithiolethaneを用いてヘキサペプチドを固相より切り出し、diethyletherで沈澱させた後、acetic acidに溶解し凍結乾燥した。各合成ペプチドについて、少量を6 N HCl で150℃ 2時間加水分解し、アミノ酸アナライザー (日光分析500) によりアミノ酸組成の確認を行った。

1 4. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli (1970)の方法による。

1 5. アガロースゲル電気泳動

a. 分画範囲、0.1kb - 10kb

試料に5x loading buffer を加え、TBE bufferで作成した適濃度 (0.7 - 1.0%) のアガロースゲルを用い、TBE buffer中でMupidにより定電圧50 Vで1 - 2時間電気泳動を行った。

b. 分画範囲、4kb - 40kb

試料に5x loading buffer を加え、0.5xTBE bufferで作成したアガロースゲル (1%) を用い、0.5xTBE buffer中で、CHEF DRII泳動槽でPulser760 (いずれもBio Rad) により、パルスフィールド電気泳動を行った。ゲルサイズは12 cm x 15 cm、電気泳動条件は1秒から13秒までの直線時間勾配、ランピング比1で電場を切り替えながら、bufferを循環させつつ7℃ 15時間行った。

いずれの方法においても電気泳動後、 $1\mu\text{g/ml}$ ethidium bromideで染色または Southern hybridizationを行い観察した。

1 6. DNA移送速度測定及びDNA飛出し実験のための同調系

DNA詰込み効率をあげるために精製 *in vitro* 系を次のように改変し、同調系として用いた。反応液 $20\mu\text{l}$ 中に、 4×10^{10} pEq プロヘッド、 $1\mu\text{g}$ gp18、 $1\mu\text{g}$ gp19、 $2\mu\text{g}$ T3DNA、ATPの代りに $10\mu\text{M}$ ATP- γ -Sを含む。これを 30°C 20分間、さらに 20°C 10分間前処理後、終濃度 $100\mu\text{M}$ になるようにATPを加えDNA移送を開始する。一定時間後に試料を $20\mu\text{l}$ ずつ採り出し、DNaseIを加えて 0°C 20分間処理し詰め込まれなかったDNAを消化する。DNA飛出し実験は次のように行った。同調系でDNA移送開始後、2.5、3及び6分後に 1mM ATP- γ -Sを加えてDNA移送を中断する。 0°C 5分後にDNaseIを加え頭殻外のDNAを消化する。gp19-wtは非特異的エンドヌクレアーゼ活性を持つので前処理中にDNAが切断を受ける事が判っている。そこでこれらの反応には、精製 *in vitro* 系ではgp19-wtと同程度のDNA詰込み活性を持ち、非特異的エンドヌクレアーゼ活性のみを喪失しているgp19-G424Eを用いた。

1 7. Southern Blotting

Southern BlottingはCurrent Protocols in Molecular Biology unit 2.9 (Ed. by Ausubel et al., 1989)に従った。DNA-DNA hybridizationは次のような条件で行った。DNA prehybridization buffer ($6\times$ SSC - $10\times$ Denhardt - $0.5\mu\text{g/ml}$ salmon sperm DNA - 0.1% SDS)中で 55°C 4-12時間処理した後、DNA hybridization buffer ($6\times$ SSC - $10\times$ Denhardt - 0.5mg/ml salmon sperm DNA - 0.1% SDS - 0.5×10^6 cpm/ml (^{32}P)-probe DNA)中 55°C で一晚処理した。洗浄は 55°C で振盪しながら、洗浄液を $6\times$ SSC - 0.1% SDS、 $2\times$ SSC - 0.1% SDS、 $0.1\times$ SSC - 0.1% SDSの順に代えて、各15分間 2回ずつ行った。DNA probeの作製は以下のとおりである。T3DNAを 0.2N HCl中で10分間処理後、 0.5M NaOH - 1.5M NaCl (終濃度)を加え更に45分間処理し、化学的にDNAを分断した。エタノール沈澱によりDNA断片を回収し、アガロースゲルにてDNAの分断状況を確認した後、DNA濃度を測定した。これをテンプレートとして、TAKARA BcaBEST Labeling Kitにより (α - ^{32}P) dCTPを用いて標識プローブを作製した。

18. 蛋白質濃度の測定

Bladford (1976) の方法に従い、Bio Rad Protein assay 染色液 (Bio Rad) を用いて、bovine serum albumin を標準として蛋白質濃度を決定した。

これらの実験に必要とされるプラスミド単離、DNA組換え等の諸技術は、Sambrook *et al.* (1988) に従った。

表 及び 図

	³² P)ATP hydrolyzed (nmol/ml)		
		+Et. Br.	+Act. D
gp19	2.2	0.21	2.0
gp19 + DNA	3.5	0.15	3.6
gp19 + prohead	1.8	N.D.	N.D.
gp19 + gp18	1.8	N.D.	N.D.
gp19 + gp18 + prohead	2.9	N.D.	N.D.
gp19 + gp18 + DNA	3.2	N.D.	N.D.
gp19 + gp18 + DNA + prohead	25.5	8.4	8.2

表1 精製 *in vitro* 系におけるATPase活性

精製 *in vitro* 系の各構成要素を含むcomplete pac buffer に100 μ MのATP及び1.5 MBq / ml (α -³²P)ATPを加え30℃ 30分間反応させ、ATP加水分解量を測定した。DNA詰め込み阻害剤として10 μ Mエチジウムブロマイド (Et. Br.) あるいは2 μ M アクチノマイシンD (Act. D) を用いた。

N.D. ; not determined.

		+ Act. D	<i>pac</i> - ATPase
dsT3DNA	100	47.8	52.2
ssT3DNA	31.3	33.2	-
Linear pUC18	109	40.3	68.7
Circular pUC18	42.3	38.9	2.3
17mer DNA	41.4	39.5	1.9
tRNA	50.3	56.8	-
no DNA	3	-	-

表2 *pac*-ATPase 活性のDNA依存性

各DNAあるいはRNA 0.5 μ g を含む精製 *in vitro*系に、100 μ MのATP及び1.5 MBq / ml (α -³²P)ATPを加え、1 μ M アクチノマイシンD存在下あるいは非存在下で30℃ 30分間反応させた。ATPase活性はT3DNAを詰込み基質としたときの活性を100とした相対値で示した。全活性とアクチノマイシンD抵抗性活性との差を*pac*-ATPase活性とした。

Proteins	Residues	Amino Acid Sequences
T3 gp19	52 - 72	<u>K</u> KF-ILQ <u>A</u> FRGIGK <u>S</u> FITCAFVV
	360 - 372	QQRILVIDPS <u>G</u> R <u>G</u> KDETGYA-VL
λ gp A	484 - 505	<u>R</u> VI-PIK <u>G</u> ASVY <u>G</u> KPVASMPKR
T4 gp17	154 - 174	<u>R</u> MTVCNLS- <u>R</u> QL <u>G</u> KTT-VVAIFL
	293 - 314	<u>H</u> FY-DIWTA <u>A</u> VEGKSGFEPYTAI
ϕ 29 gp16	17 - 39	<u>R</u> ILNFVIG <u>A</u> R <u>G</u> IGK <u>S</u> YAMKVYPI
DnaA	164 - 184	YNPLFLYGGT <u>G</u> L <u>G</u> KTT-FAMNLV
RecA	60 - 80	<u>R</u> -IVEIYGP <u>G</u> SSGKT-LTLQVI
ATPase α of <i>E.coli</i>	164 - 184	<u>R</u> --ELIIG <u>D</u> R <u>G</u> T <u>G</u> KTALAIDAI I
Myosin of rabbit	173 - 192	S--ILIT <u>G</u> ES <u>G</u> AGKT-NTKKVI
T3 gp19	418 - 435	VFESNFGD <u>G</u> MFGKVFSPL
Bovin PKA	44 - 62	ERIKTL <u>G</u> T <u>G</u> SFG <u>R</u> VMLVKH
RSV p60 ^{src}	269 - 287	RLEAKL <u>G</u> Q <u>G</u> CF <u>G</u> EVWMGTW
EGF Receptor	690 - 707	KI-KVL <u>G</u> SGAF <u>G</u> TVYKGLW
FSV ^{gag-fps}	923 - 941	LLGERIG <u>R</u> GNF <u>G</u> EVFSGR

表3 T3gp19及び他の蛋白質に存在するATP結合共通配列

共通配列に下線を付した。

Proteins	Substitution	Sequences	Restriction enzymes
ATP binding motif I		(60)R G I G K S(65)	
WT		--CGT GGT ATC GGT AAG TCG--	none
G61D	Gly Asp	--CGT <u>GAT ATC</u> GGT AAG TCG--	EcoR V
G63D	Gly Asp	--CGT GGT <u>ATC GAT</u> AAG TCG--	Cla I
K64T	Lys Thr	--CGT GGT ATC <u>GGT ACC</u> TCG--	Kpn I
ATP binding motif II		(366)S G R G K D(371)	
WT		--AGT GGT CGA GGT AAG GAT--	none
G367D	Gly Asp	--AGC <u>GAT CGA</u> GGT AAG GAT--	Pvu I
G369D	Gly Asp	--AGT GGT <u>CGC GAT</u> AAG GAT--	Nru I
K370I	Lys Ile	--AGT GGT CGA GGT <u>ATC GAT</u> --	Cla I
ATP binding motif III		(423)F G D G M F G K V(431)	
WT		--TTC GGG GAT GGT ATG TTT GGT AAG GTA--	none
G424E	Gly Glu	-- <u>TTC GAA</u> GAT GGT ATG TTT GGT AAG GTA--	Nsp7524 V
G429L	Gly Leu	--TTC GGG GAT GGT ATG TTT <u>CTT AAG</u> GTA--	Afl II
G429R	Gly Arg	--TTC GGG GAT GGT ATG TTT <u>CGA AAG</u> GTA--	Nsp7524 V
K430T	Lys Thr	--TTC GGG GAT GGT ATG TTT <u>GGT ACC</u> GTA--	Kpn I

表4 変異gp19の作製

説明は次頁。

Proteins	Substitution	Sequences	Restriction enzymes
<i>Mg²⁺ binding motif I</i>		(343)I H S Y H S(348)	
WT		--ATT CAT AGC TAT CAT TCG--	none
H344D	His Asp	-- <u>ATC</u> GAT AGC TAT CAT TCG--	Cla I
H347R	His Arg	--ATT CAT AGC <u>TAT</u> CGA TCG--	Cla I
<i>Mg²⁺ binding motif II</i>		(552)E H P(554)	
WT		--GAG CAC CCA--	none
H553L	His Leu	-- <u>GAG</u> CTC CCA--	Sac I
<i>C-terminal deletion</i>		(570)E L Y W E D D D V(578)	
WT		--GAA CTC TAT TGG GAG GAT GAC GAT GTG--	none
Δ C15	Tyr stop	--GAA <u>CTC</u> TAG <u>AGG</u> GAG GAT GAC GAT GTG--	Xba I
Δ C10	Asp stop	--GAA CTC TAT TGG GAG GAT <u>GAC</u> TAG TTG --	Spe I

表4 変異gp19の作製

遺伝子19の1から3塩基を、新たな制限酵素部位が生ずるように置換することにより、1アミノ酸置換あるいは終止コドンを導入した。変異部位近傍の塩基配列及びアミノ酸配列を示し、置換した塩基を太字で、新たに現れる制限酵素部位を下線で示した。

gp19	Packaging Activity (% of WT)	
	crude system	defined system
—	0.16	0.00
WT	100	100
G61D	0.054	0.4
G63D	0.47	25.1
K64T	96.7	104
H344D	3.9	1.7
H347R	1.21	55.2
G367D	0.47	23.2
G369D	1.72	77.0
K370I	65.8	96.1
G424E	2.6	121.6
G429L	35.5	98.3
G429R	27.3	16.3
K430T	69.6	65.9
H553L	126	110.5

表5 変異gp19の粗及び精製*in vitro*系におけるDNA詰込み活性

各変異gp19を含む粗あるいは精製*in vitro*系においてDNA詰込み反応を行った後、成熟頭部を感染性粒子として計数し、詰込み活性を測定した。詰込み活性はgp19-wtの詰込み活性を100とした相対値で示した。

gp19	³² P- ATP hydrolyzed (nmol/ml)	
	<i>non-pac</i> ATPase	<i>pac</i> ATPase
WT	27.8 ± 4.2	17.6 ± 1.6
ATP-binding I		
G61D	19.0 ± 3.1	1.6 ± 0.6
G63D	N.D.	N.D.
K64T	N.D.	N.D.
Mg ²⁺ -binding I		
H344D	24.0 ± 3.8	2.0 ± 0.5
H347R	N.D.	N.D.
ATP-binding II		
G367D	24.2 ± 4.6	13.0 ± 2.1
G369D	22.0 ± 3.5	13.2 ± 1.1
K370I	68.0 ± 10.1	17.0 ± 1.9
ATP-binding III		
G424E	25.6 ± 5.2	16.6 ± 1.8
G429L	24.2 ± 4.2	25.4 ± 2.3
G429R	27.4 ± 5.0	24.2 ± 3.3
K430T	42.2 ± 6.2	17.6 ± 1.8
Mg ²⁺ -binding II		
H553L	N.D.	N.D.

表6 各変異gp19の精製*in vitro*系における*pac*-ATPase及び*nonpac*-ATPase活性

各変異gp19を含む精製*in vitro*系に、100μMのATP及び1.5 MBq / ml (α-³² P)ATPを加え、1μMアクチノマイシンD存在下あるいは非存在下で30℃ 30分間反応させ、ATP加水分解量を測定した。

Group	gp19	Packaging efficiency		Functions				Motif
		crude	defined	ATPase activity	Interaction with ATP	DNA cleavage	Prohead binding	
	WT	++	++	+	+	+	+	
1	G61D	—	—	—	—	+	++*	A-I
	H344D	—	—	—	—	+	++*	M-I
2	G429R (G429L)	+	+	++	+	+	+	A-III (A-III)
3	G63D	—	+	N.D.	+	—	+	A-I
	G367D	—	+	+	+	—	+	A-II
	G369D	—	++	+	+	—	+	A-II
	G424E	—	++	+	+	—	+	A-III
	H347D	—	++	N.D.	+	+	+	M-I
4	K64T	++	++	N.D.	+	+	+	A-I
	K370I	++	++	+	+	+	+	A-II
	G429L	+	++	++	+	+	+	A-II
	K430T	++	++	+	+	+	+	A-III
	H553L	++	++	N.D.	+	+	+	M-II

表7 変異gp19の性質

gp19-wtの各活性を++（DNA詰込み）あるいは+（その他の活性）とし、変異gp19の各活性を相対的に表した。ATP及びMg²⁺結合共通配列をそれぞれA及びMとして表した。

N.D. ; not determined。

* ; 不活性型複合体。

exp. No.	1st reaction		2nd reaction (10min) 50S complex formation & DNA translocation	DNA packaging activity (x10 ⁷ PFU/ml)			
	gp19-prohead complex formation (5min)	(5min)		gp19wt		gp19ΔC10	
1	phd	+gp19	+ gp18-DNA complex	146	(100)	18.0	(100)
2	(phd+gp19)	+6pT3	+ gp18-DNA complex	67.0	(45.9)	5.5	(30.6)
3	(phd+ 6pT3)	+gp19	+ gp18-DNA complex	2.8	(1.92)	0.0091	(0.051)

表8 6pT3のDNA詰込みの各素過程に対する影響

精製 *in vitro* 系におけるDNA詰込み反応を第一反応（gp19-プロヘッド複合体形成反応）と第二反応（50S複合体形成及びDNA移送反応）に分けた。第一反応は、プロヘッド単独（exp. 1）、プロヘッド+gp19（exp. 2）、プロヘッド+6pT3（exp. 3）にて5分間、続いてgp19、6pT3、gp19をそれぞれ加えてさらに5分間行った。第一反応後、1/10容の10x gp18-DNA複合体反応液を加えることにより第二反応を開始した。10分間反応後、成熟頭部を感染性粒子として計数した。括弧内にはDNA詰込み活性を相対値で表してある。

exp. No.	1st reaction			2nd reaction (10min) 50S complex formation & DNA translocation	DNA packaging activity (x10 ⁻⁵ PFU/ml)			
	gp19-prohead complex formation (5min)	(5min)			gp19wt		gp19ΔC10	
1	phd	+gp19	10 ⁻²	+ gp18-DNA complex	550	(100)	9.5	(100)
2	phd	+gp19	10 ⁻²	+ gp18-DNA complex + 6pT3	260	(47.3)	0.009	(0.095)
3	(phd+ 6pT3)	+gp19	10 ⁻²	+ gp18-DNA complex	335	(60.9)	0.62	(6.53)
4	(phd+ 6pT3)	+gp19	10 ⁻²	+ gp18-DNA complex + 6pT3	4.20	(0.764)	0.005	(0.053)

表9 希釈実験における6pT3のDNA詰込み各素過程に対する影響

第一反応は、プロヘッド単独 (exp. 1及び2)、プロヘッド+6pT3 (exp. 3及び4) にて5分間、続いてgp19を加えて5分間行った。反応液をcomplete pac bufferを用いて1/100希釈し、gp18-DNA複合体 (exp. 1及び3) またはgp18-DNA複合体+6pT3 (exp. 2及び4) を含む反応液に加えることにより第二反応を開始した。10分間反応後、成熟頭部を感染性粒子として計数した。括弧内にはDNA詰込み活性を相対値で表してある。第一、第二両反応に6pT3を含む場合 (exp. 4) は、1/100希釈は6pT3を含むcomplete pac bufferを用いて行った。

Time (min)	packaged DNA (kb)	DNA in heads after ejection (kb)
2.5	24.0	23.8
3.0	28.9	25.9
6.0	38.5	38.5 + 25.9

表 1 0 ATP- γ -S添加による頭殻からのDNA飛出し反応

図 3 5 の結果から、各時間における頭殻内のDNA長を算出した。

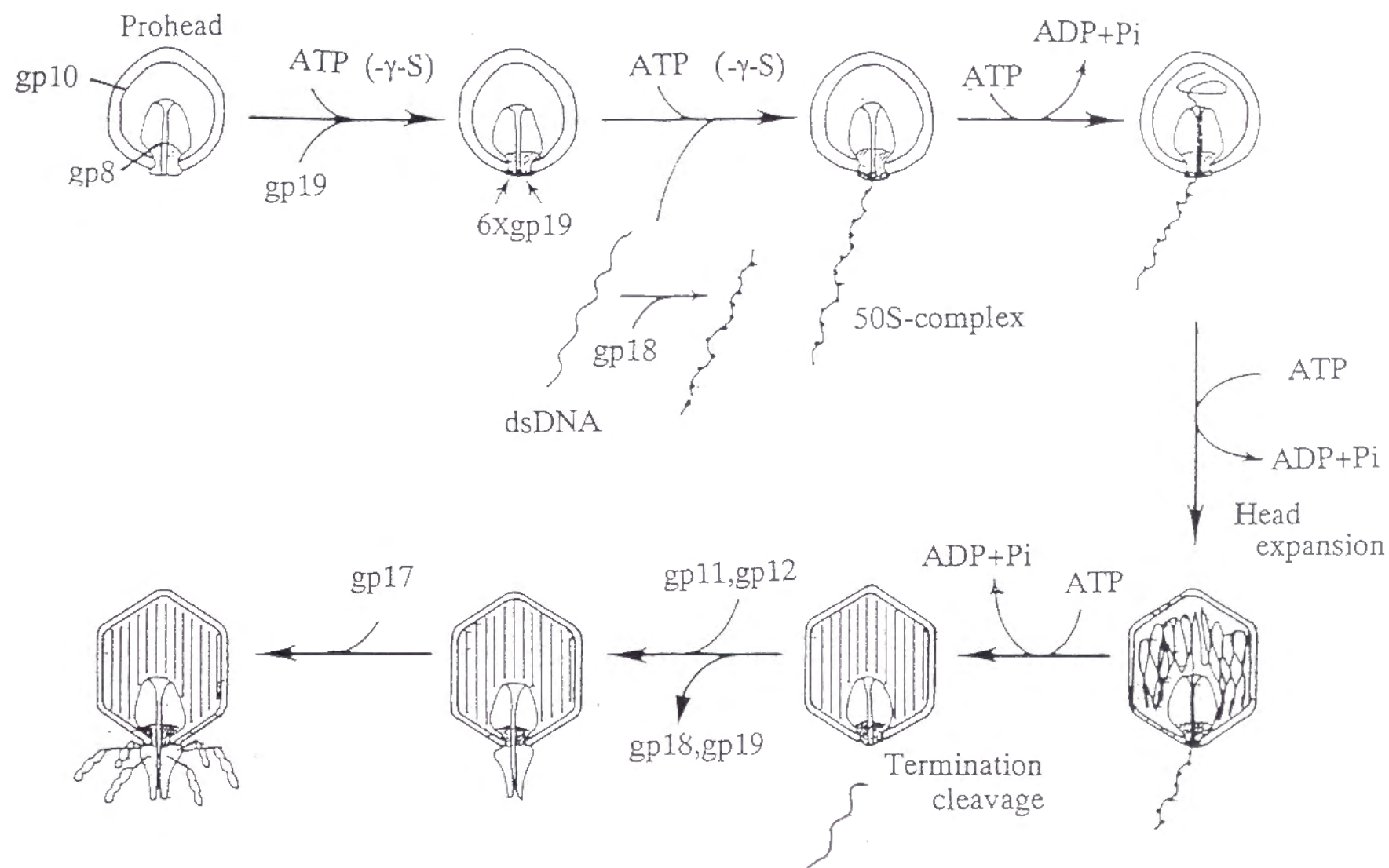


図1 バクテリオファージT3の粒子形成経路

本文参照

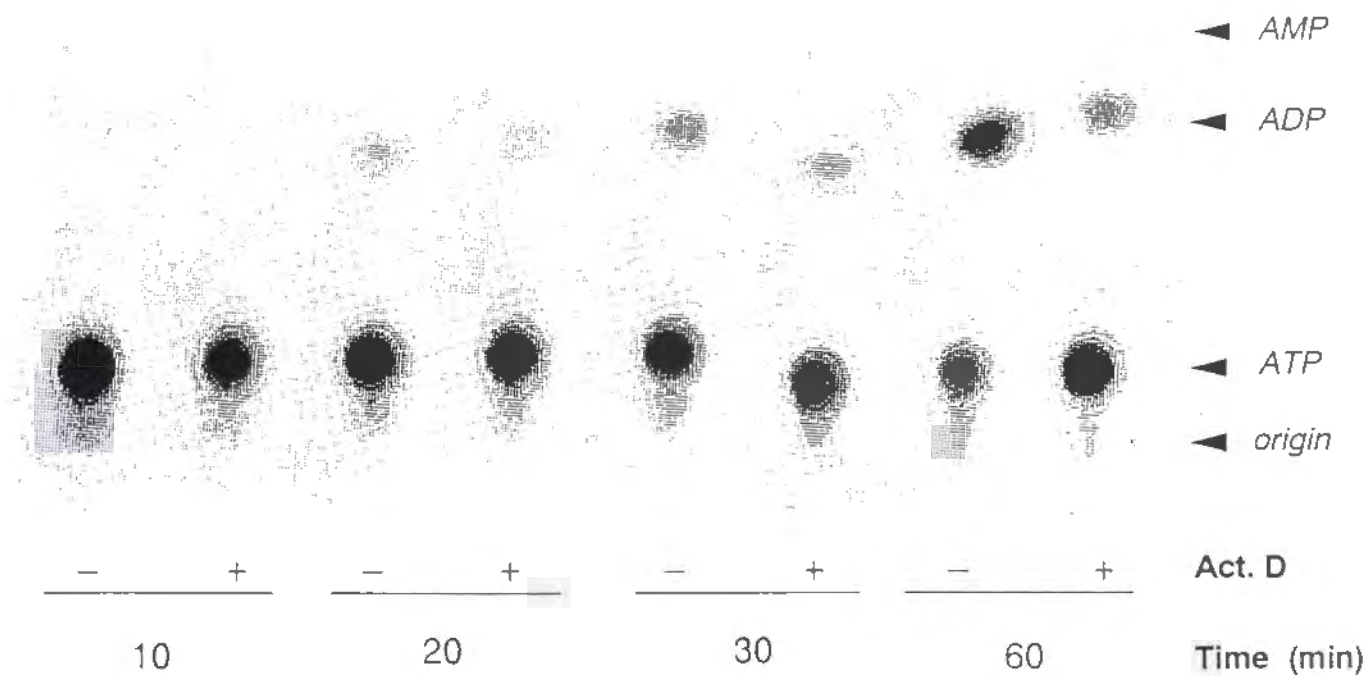


図2 精製 *in vitro* 系におけるATP加水分解

精製 *in vitro* 系で30℃ 各時間反応後、反応液を薄層クロマトグラフィーにより展開し、各スポットの放射活性を測定した（材料と方法）。ATP、ADP、AMP、展開起点をそれぞれ図中に示す。

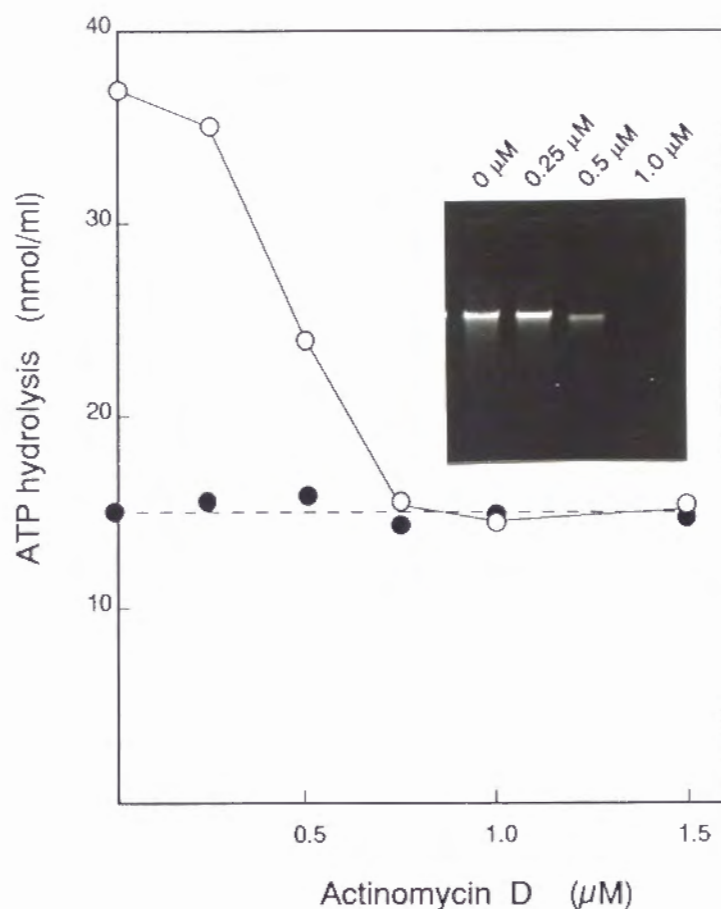


図3 精製 *in vitro* 系におけるDNA詰込み活性及びATPase活性に及ぼすアクチノマイシンDの影響

100μM (α - 32 P) ATP及びpUC18DNA (●) またはT3DNA (○) を含む精製 *in vitro* 系において各濃度のアクチノマイシンD存在下で30℃ 30分間反応を行い、ATP加水分解量を測定した。T3DNAを詰込み基質とした試料を用いてアガロースゲル(0.8%)電気泳動を行い、頭殻内のDNAをエチジウムブロマイド染色により観察し、DNA詰込み活性を調べた(挿入図)。

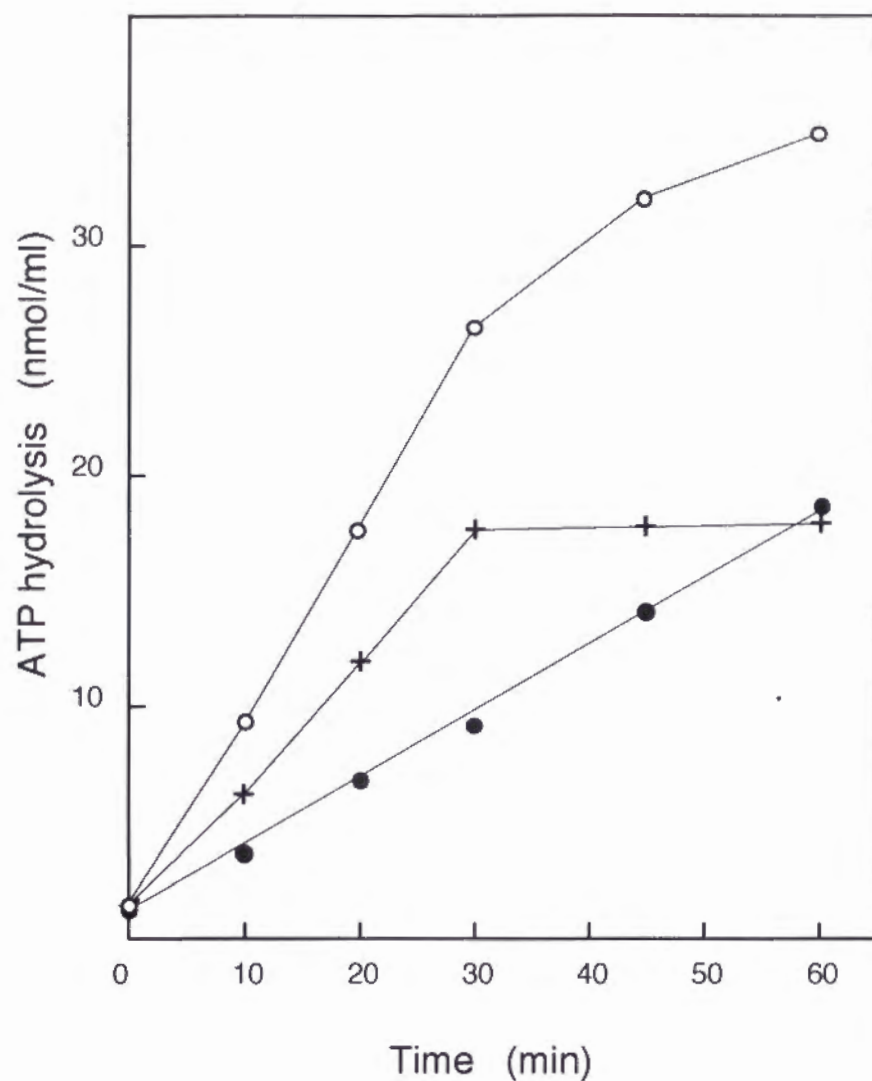


図4 精製*in vitro*系におけるATPase活性の時間経過

100 μ M (α - 32 P) ATPを含む精製*in vitro*系を1 μ M アクチノマイシンD存在下(●)あるいは非存在下(○)で反応させ、ATP加水分解量を測定した。(+) ; 全活性とアクチノマイシンD抵抗性の活性との差、即ちDNA移送に共役した*pac*-ATPase活性。

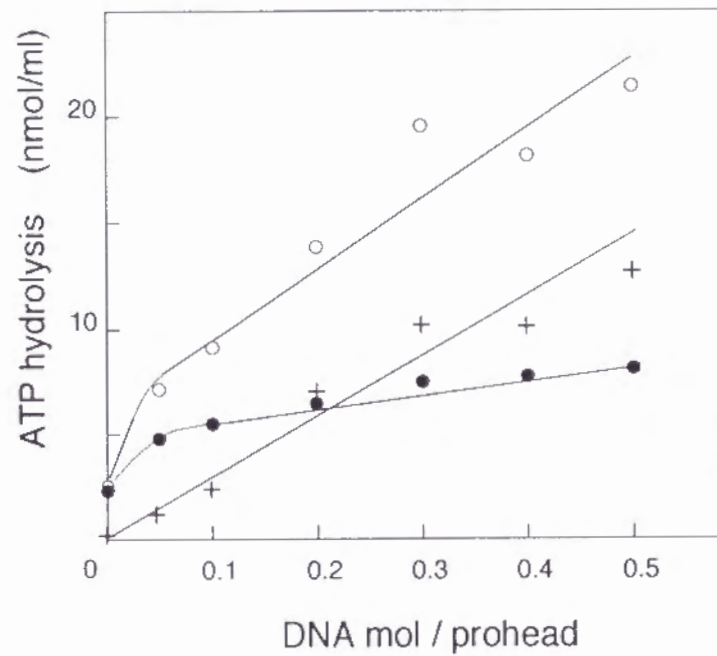


図5 精製 *in vitro* 系のATPase活性のDNA濃度依存性

DNAを各DNA/プロヘッド比で含む精製系において反応を $1\mu\text{M}$ アクチノマイシンD存在下(●)あるいは非存在下(○)で行い、ATPase活性を測定した。(+) ; *pac*-ATPase活性。

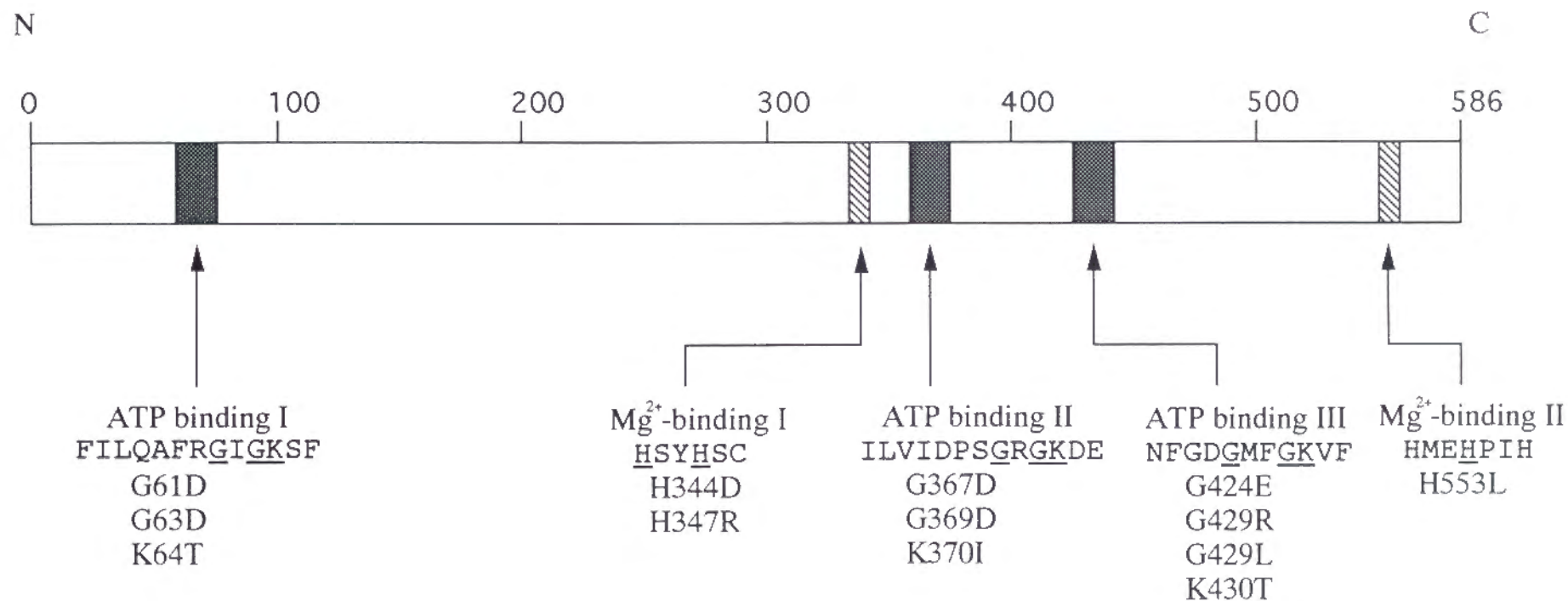


図6 gp19に存在するATP及びMg²⁺結合共通配列への部位特異的変異の導入

各ATP及びMg²⁺結合共通配列に、表4に示すような変異の導入を行い、下線で示したアミノ酸残基を置換して13種の変異gp19を得た。アミノ酸配列はDNA塩基配列から予測し（Yamada et al., 1986）、Mを1として番号付けを行なった。

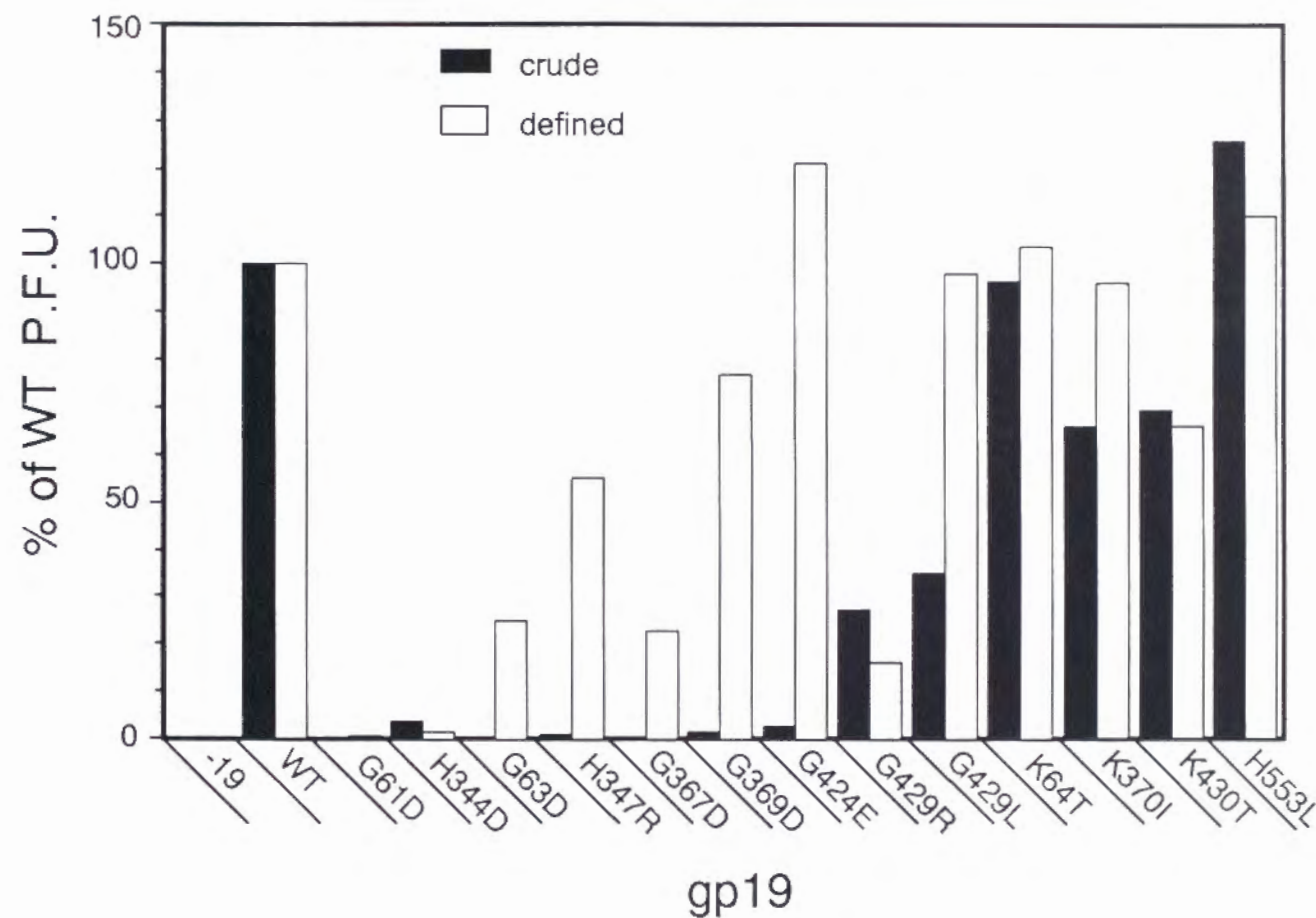


図7 各変異gp19の粗及び精製*in vitro*系におけるDNA詰込み活性

表5で得られた結果に基づき、各変異gp19の詰込み活性をgp19-wtの活性を100とした相対値で表した。

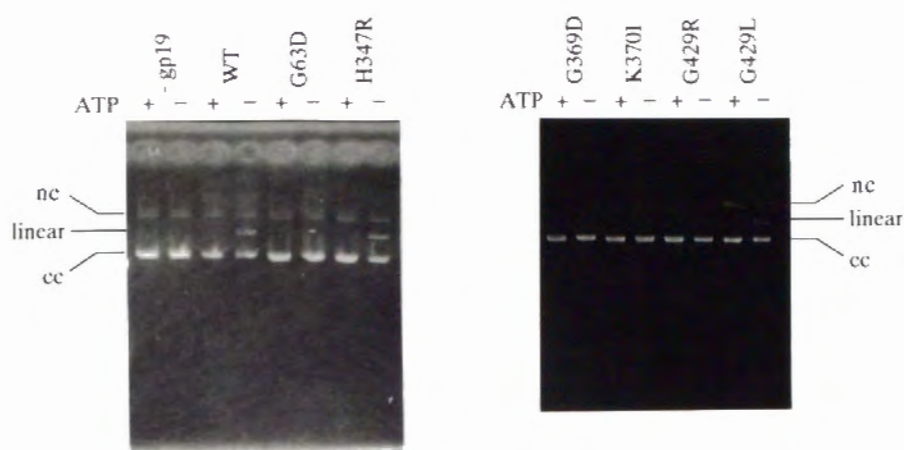
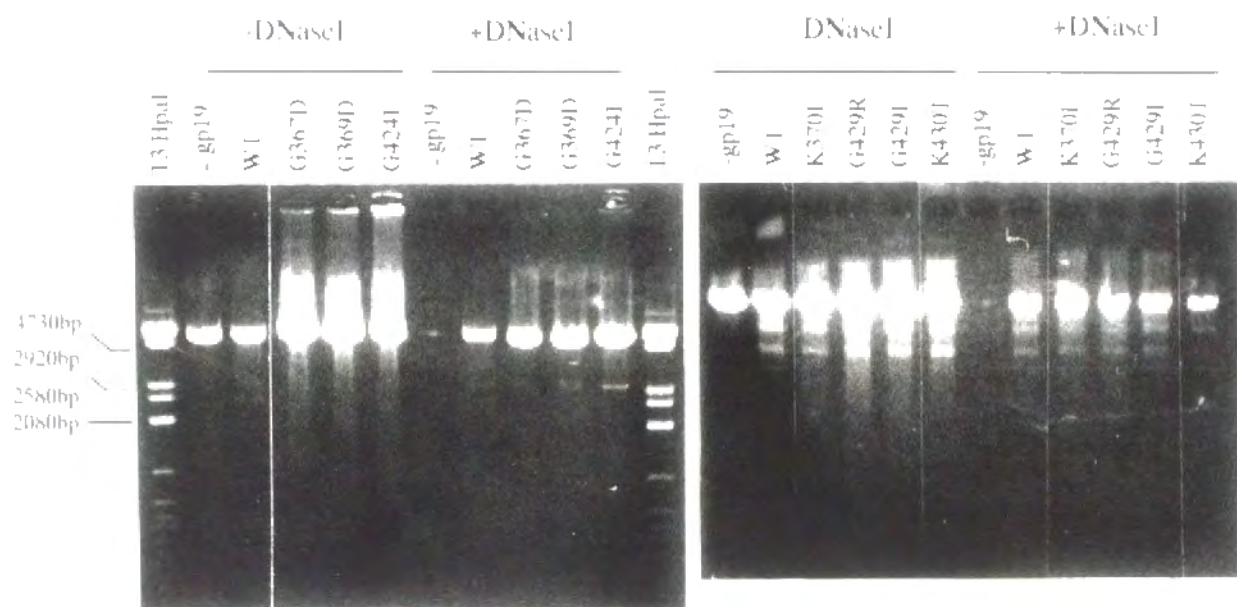


図8 各変異gp19の非特異的エンドヌクレアーゼ活性

環状 pUC18 E1TRDNA を gp19 と、ATP 存在下あるいは非存在下で pac buffer 中で、30℃ 60 分間反応させた後電気泳動を行い、線状 DNA の生成を観察した。閉環状 (closed circular ; cc)、開環状 (nicked circular ; nc) 及び線状 (linear) pUC18 E1TRDNA の位置を図中に表示してある。図には示さないが、gp19-K64T、gp19-K430T、gp19-H553L は gp19-wt と、gp19-G367D、gp19-G424E は gp19-G63D と同様の活性を持っていた。gp19-G61D、gp19-H344D に関しては、本文及び Kimura and Fujisawa (1991) 参照。

(A)



(B)

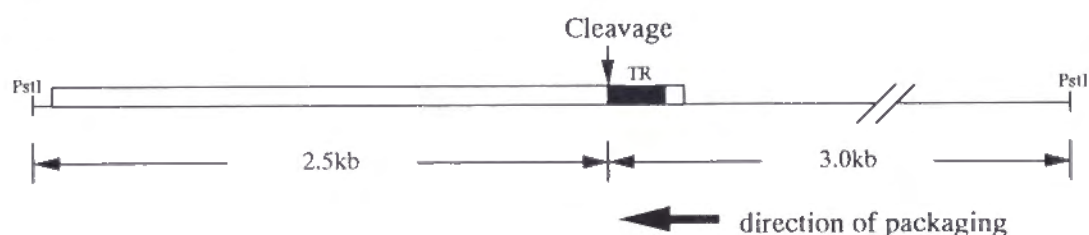


図9 精製*in vitro*系における詰込みに共役したTR配列切断活性

(A) 線状化した pUC18 E1TRDNA を詰込み基質とし、250 μ M ATP を含む精製 *in vitro* 系で 30 $^{\circ}$ C 60 分間反応を行った後、5x sample buffer または DNaseI を加えた。DNaseI を加えた試料は、0 $^{\circ}$ C 20 分間処理し、5x sample buffer を加えて反応を停止した。1.0% アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウム染色した。図には示さないが、gp19-K64T、gp19-H347R、gp19-H553L は gp19-wt と、gp19-G63D は gp19-G367D と同様の活性を持っていた。gp19-G61D、gp19-H344D に関しては本文及び Kimura and Fujisawa (1991) 参照。

(B) TR 配列左端での DNA 切断を図で表した (本文参照)。DNA 詰込みの方向と切断部位を矢印で示した。

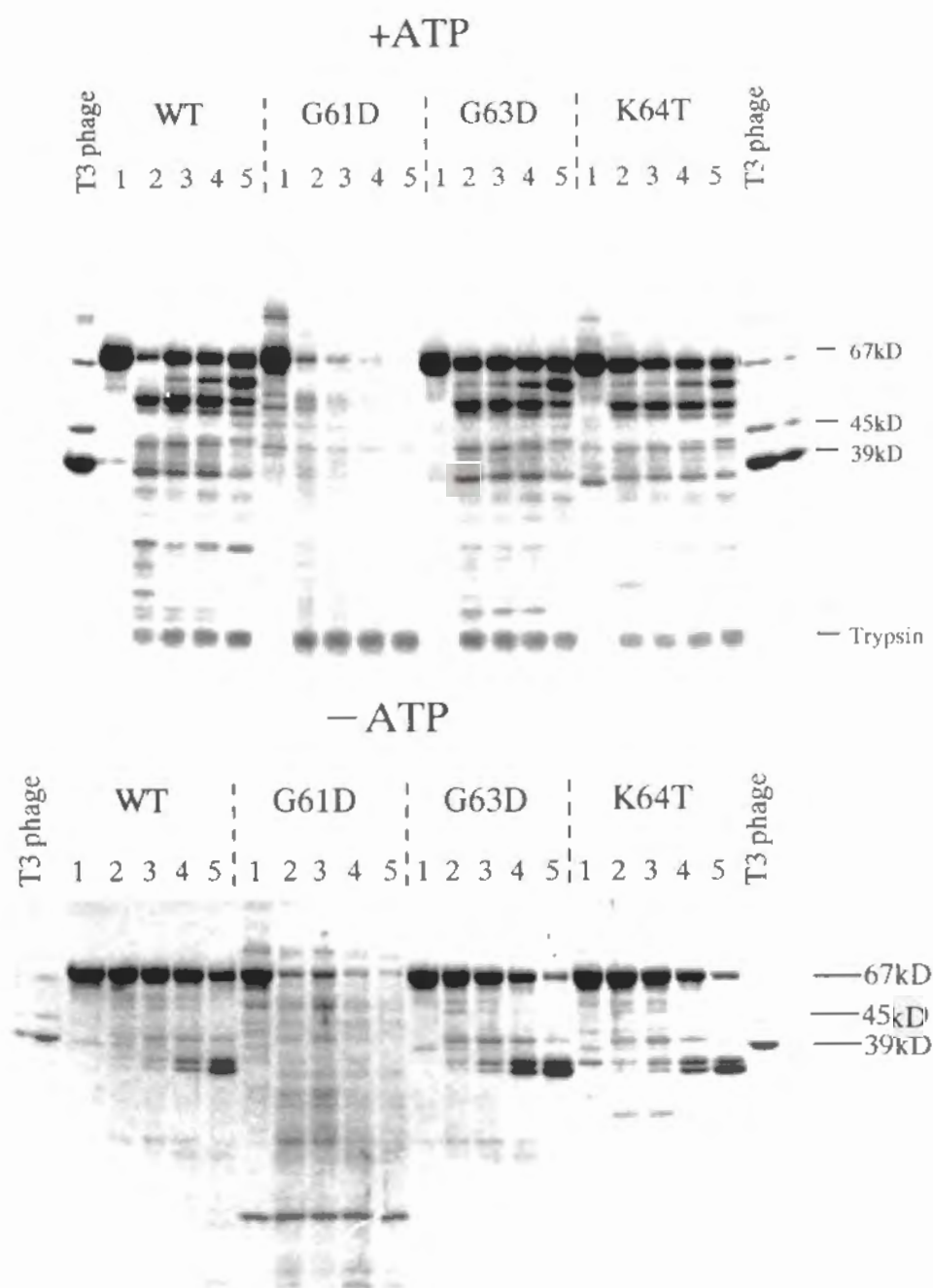


図 10 gp19のトリプシン感受性に対するATPの影響

説明次頁

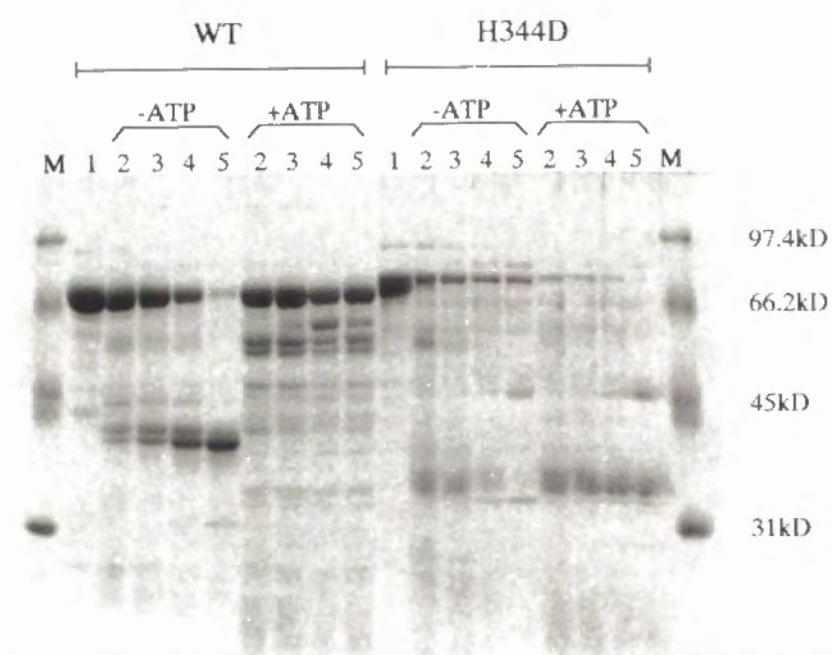


図 1 0 gp19のトリプシン感受性に対するATPの影響

gp19 (2.5 μ g/20 μ l) をATP存在下あるいは非存在下で、それぞれ2 μ gあるいは0.1 μ gのトリプシンを加えて20 $^{\circ}$ C 各時間処理した。lane 1; 0 min、lane 2; 5 min、lane 3; 10 min、lane 4; 30 min、lane 5; 90 min。反応後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(12.5%)を行なった。図には示さないが、他の変異gp19の限定分解パターンはgp19-wtのそれと同様であった。

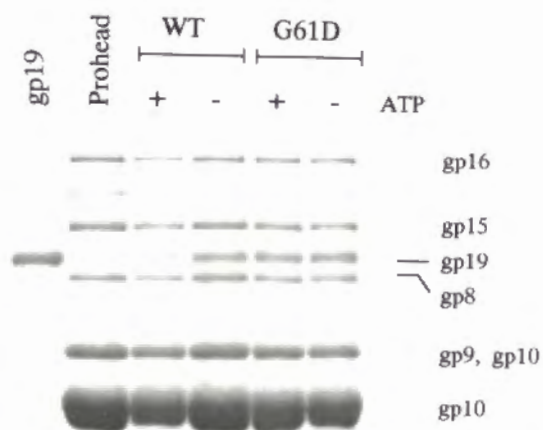


図 1 1 gp19-プロヘッド結合実験

gp19-wtあるいはgp19-G61DをプロヘッドとATP存在下（+）、非存在下（-）で30℃ 30分間反応させ、超遠心によりgp19-プロヘッド複合体を分離し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（12.5%）を行なった。図には示さないが、gp19-H344Dはgp19-G61Dと同様のプロヘッド結合活性を示した。

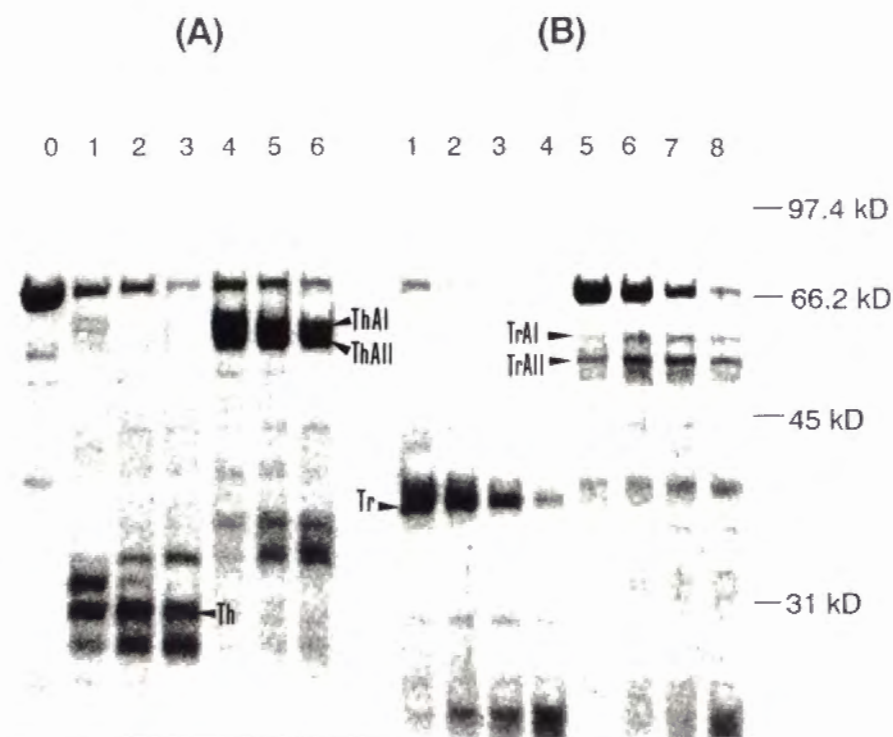


図 1 2 gp19のトリプシン及びサーモリシンによる限定分解

gp19 (2.5 μ g/20 μ l) を各量のサーモリシン (A) あるいはトリプシン (B) を用いて20 $^{\circ}$ C 30分間限定分解を行なった後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (12.5%) を行なった。

(A) それぞれ0.1 μ g (lanes 1及び4)、0.2 μ g (lanes 2及び5)、0.5 μ g (lanes 3及び6) のサーモリシンを用いて、ATP非存在下 (lanes 1-3) あるいは存在下 (lanes 4-6) で反応を行なった。lane 0; 未処理のgp19。

(B) それぞれ0.1 μ g (lanes 1及び4)、0.2 μ g (lanes 2及び5)、0.5 μ g (lanes 3及び6)、1.0 μ g (lanes 4及び8) のトリプシンを用いて、ATP非存在下 (lanes 1-4) あるいは存在下 (lanes 5-8) で反応を行なった。lane 0; 未処理のgp19。主要断片 (Th、ThA I、ThA II、Tr、TrA I、TrA II) を矢頭で示す。

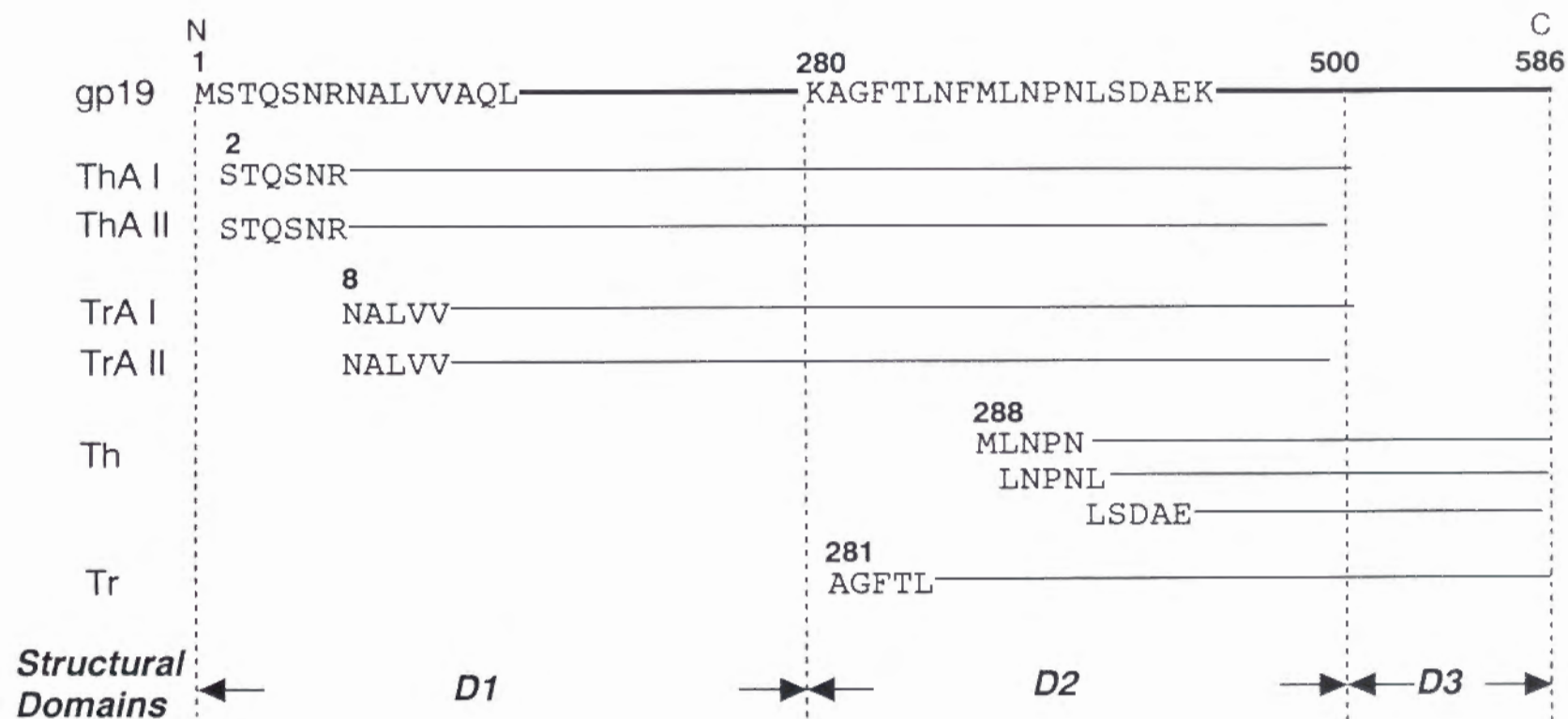


図1-3 プロテアーゼ限定分解により生ずる各主要断片のN末端アミノ酸配列の決定

プロテアーゼ限定分解により生じた主要断片をSDSポリアクリルアミドゲルから回収し、N末端の5アミノ酸残基の配列を決定した。Th、Tr断片はそれぞれサーモリシン、トリプシンを用いたATP非存在下での限定分解により生じる。ThA IとThA II断片及びTrA IとTrA II断片はそれぞれサーモリシン及びトリプシンを用いたATP存在下での限定分解により生じる。Thバンドはシーケンシングの結果から判断して、各N末端を持つ3種のポリペプチドの混合物であると考えられる。各断片のC末端を分子量から予測し、各断片のgp19上での位置を表した。gp19は3つの構造上のドメイン（D1、D2、D3）に分けられる（本文参照）。

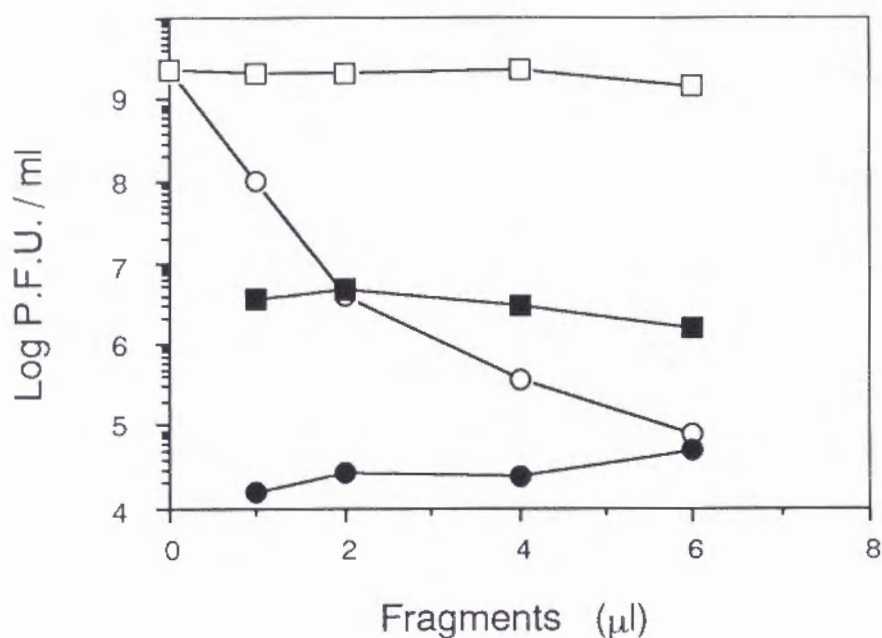


図14 トリプシン限定分解物のDNA詰込み活性に及ぼす影響

gp19 (2.5μg/20μl) を0.1μgのトリプシンを用いてATP存在下 (□, ■)、非存在下 (○, ●) で20℃ 30分間限定分解を行なった後、soybean trypsin inhibitor 添加し、反応を停止させた。この限定分解物を精製 *in vitro* 系 (□, ○) あるいはgp19を除いた精製 *in vitro* 系 (■, ●) に加え、30℃ 30分間詰込み反応を行なった。成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することによりDNA詰込み活性を測定した。

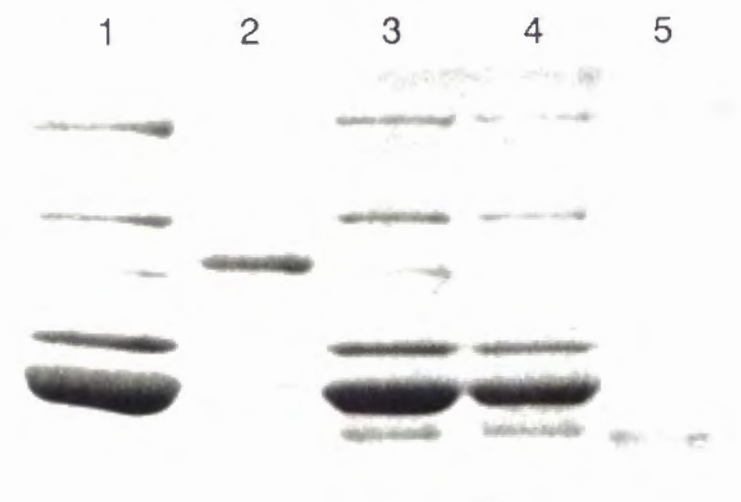


図15 Tr断片のプロヘッド結合能

gp19 (2.5 μ g/20 μ l) を0.1 μ gのトリプシンを用いてATP非存在下で20 $^{\circ}$ C 30分間限定分解を行なった後、soybean trypsin inhibitor 添加し、反応を停止させた。この限定分解物をプロヘッドとATP非存在下あるいは存在下で反応させ、超遠心により得たプロヘッド分画をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(12.5%)で解析した。lane 1; プロヘッド、lane 2; gp19、lane 3; ATP非存在下でのプロヘッド分画、lane 4; ATP存在下でのプロヘッド分画、lane 5; 限定分解物。

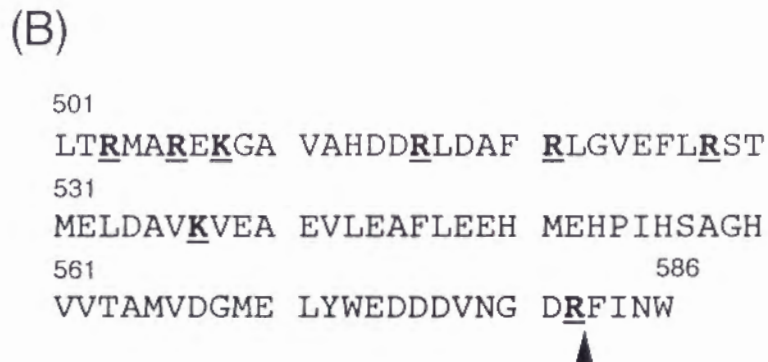
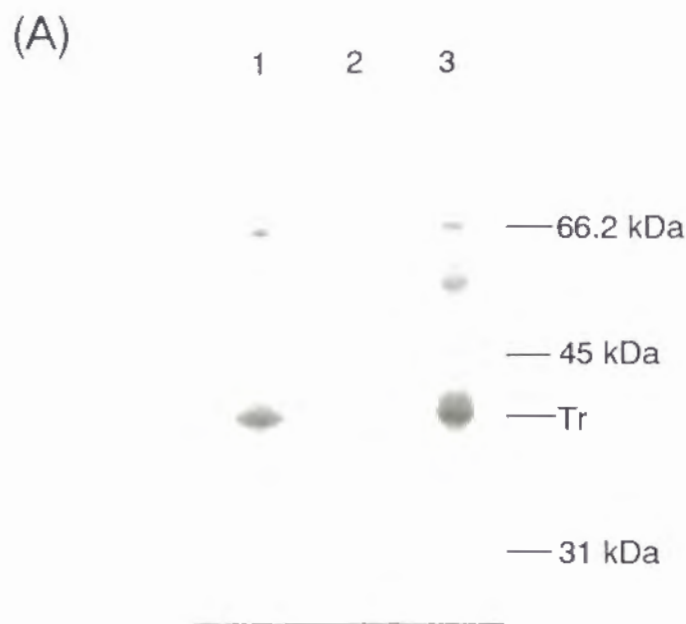


図 1 6 Tr断片のC末端解析

(A) gp19 (0.125mg) を含むpac buffer 1 mlに0.025mgのトリプシンを加え、20℃ 30分間限定分解を行なった後、5 mM DIPFを加えて反応を停止させた。反応液をanhydrotrypsin agaroseカラムに上層した。lane 1; 限定分解物、lane 2; 非吸着分画、lane 3; 吸着分画。

(B) gp19のC末端に存在するトリプシン認識部位を下線・太字で示した。Tr断片の分子量から判断したC末端部位を矢頭で示した（本文参照）。

		Packaging activity (P.F.U. / ml)
gp19-wt	⁵⁶⁰ ⁵⁷⁰ ⁵⁸⁰ ---HVVTAMVDGMELYWEDDDVNGDRFINW	1.48×10^9
gp19-ΔC10	⁵⁷⁶ ---HVVTAMVDGMELYWEDD	1.72×10^8
gp19-ΔC15	⁵⁷¹ ---HVVTAMVDGMEL	$< 1.20 \times 10^3$

図17 C末端欠失変異gp19のC末端領域のアミノ酸配列及び精製*in vitro*系におけるDNA詰込み活性

gp19-wt及びC末端欠失変異gp19 (gp19ΔC10、gp19ΔC15) のC末端領域のアミノ酸配列を示した。gp19ΔC10及びgp19ΔC15は、C末端の10及び15アミノ酸残基をそれぞれ欠失している。gp19-wtの代わりに各変異gp19を精製*in vitro*系に加え、30℃ 30分間DNA詰込み反応を行なった後、成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することによりDNA詰込み活性を測定した。

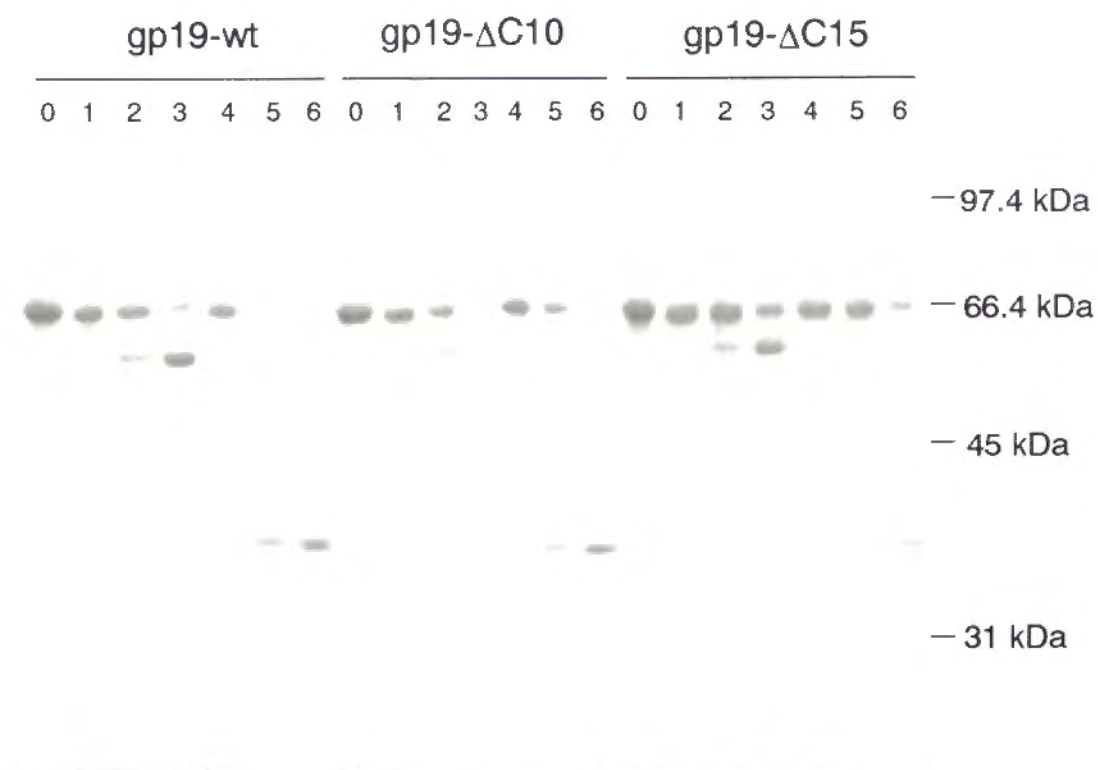


図 1 8 C末端欠失変異gp19のトリプシンを用いた限定分解

gp19 (2.5 μ g/20 μ l) をATP存在下 (lanes 1 - 3) あるいは非存在下 (lanes 4 - 6) で、それぞれ0.5 μ g、0.1 μ gのトリプシンを用いて20 $^{\circ}$ C 各時間反応させた後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (12.5%) を行なった。lane 0; 0 min、lanes 1、4; 10 min、lanes 2、5; 30 min、lanes 3、6; 60 min。

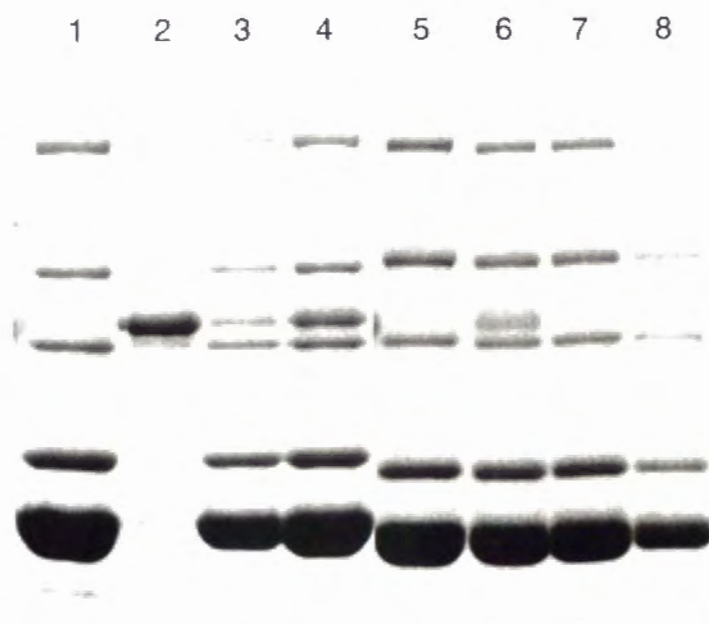


図 1 9 gp19 Δ C10及びgp19 Δ C15のプロヘッド結合能

ATP存在下あるいは非存在下で、gp19をプロヘッドと30℃ 30分間反応させた後、超遠心によりプロヘッド分画を分離し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（12.5%）を行った。lane 1; プロヘッド、lane 2; gp19-wt、lanes 3、4; gp19-wtをそれぞれATP存在下、非存在下で反応させた場合、lanes 5、6; gp19 Δ C10をそれぞれATP存在下、非存在下で反応させた場合、lanes 7、8; gp19 Δ C15をそれぞれATP存在下、非存在下で反応させた場合。

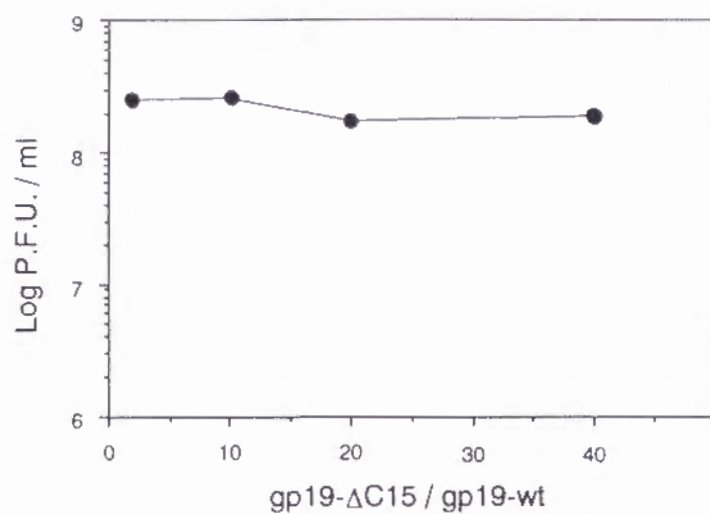


図 2 0 精製 *in vitro* 系の DNA 詰込み活性に及ぼす gp19ΔC15 の影響

精製 *in vitro* 系に、各モル比 (gp19ΔC15/gp19-wt) の gp19ΔC15 を加えて 30°C 30 分間反応を行い、生じた成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することにより DNA 詰込み活性を測定した。

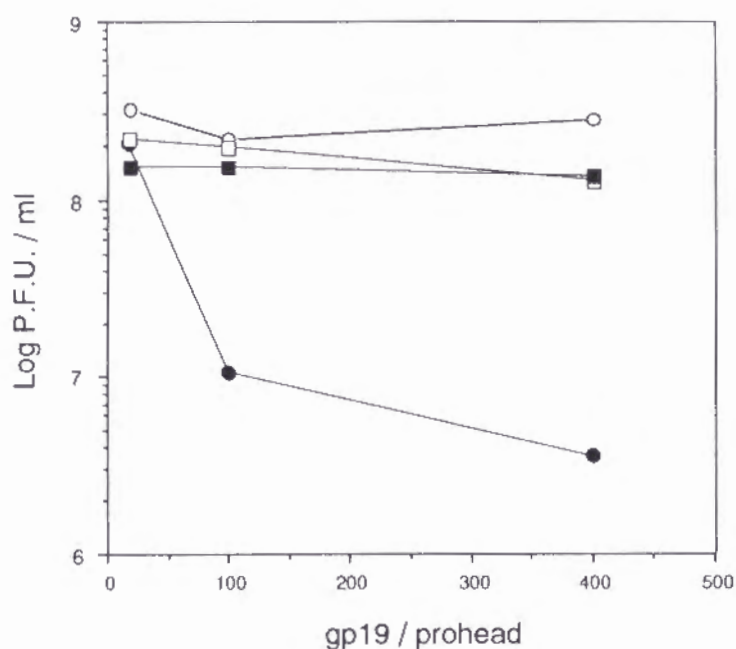


図2 1 gp19とプロヘッドの前反応がDNA詰込み活性に及ぼす影響

プロヘッド (2×10^{10} peq) と各モル比 (gp19/プロヘッド) のgp19-wt (○, ●) あるいはgp19ΔC15 (□, ■) をcomplete pac buffer (○, □) あるいはATPを除いたcomplete pac buffer中 (●, ■) で30℃ 30分間前反応を行なう。前反応液をプロヘッドを除いた精製*in vitro*系に加え、30℃ 30分間DNA詰込み反応を行い、生じた成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することによりDNA詰込み活性を測定した。

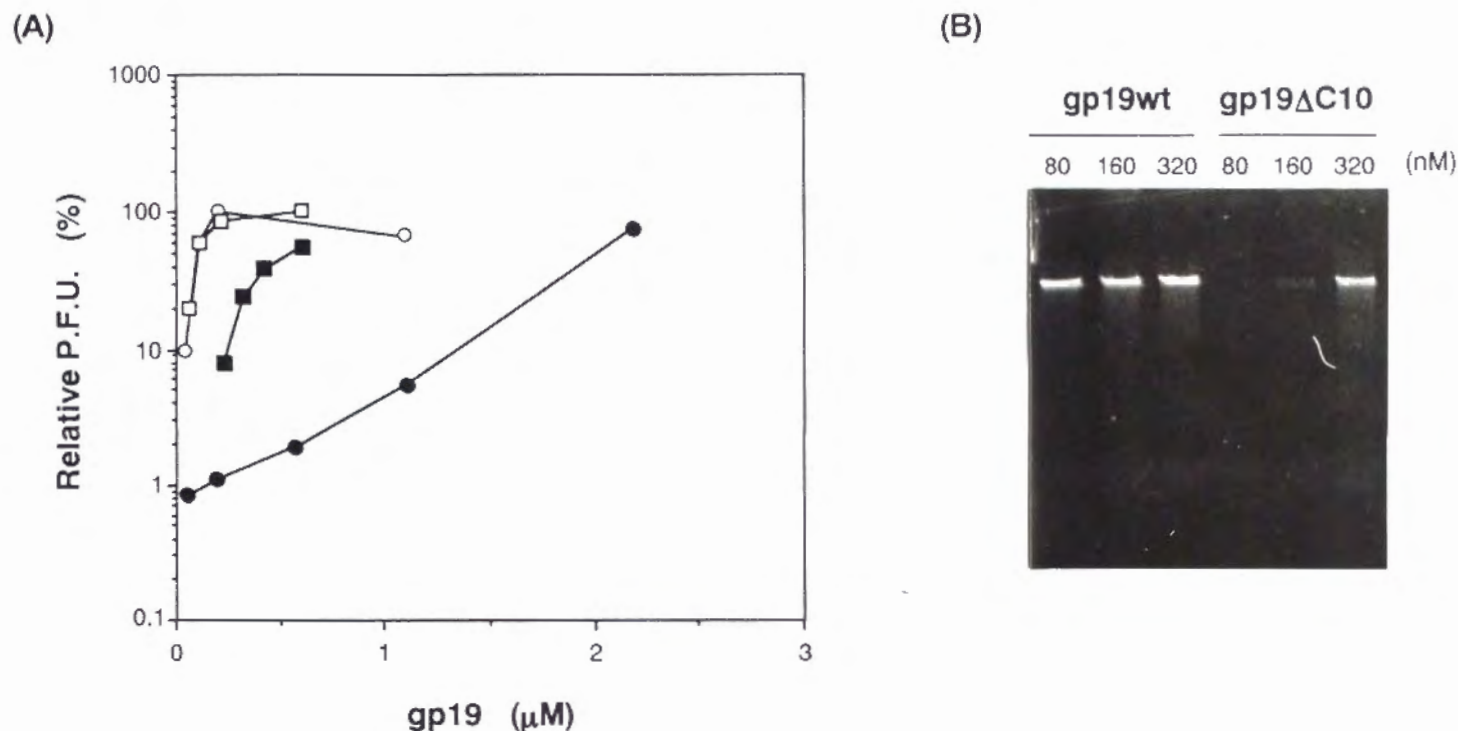


図 2 2 gp19-wt及びgp19 Δ C10の精製*in vitro*詰込み系におけるgp19蛋白質濃度依存性

(A) 2×10^{10} peq (□, ■) あるいは 2×10^9 peq (○, ●) のプロヘッド及び各濃度のgp19-wt (□, ○)、gp19 Δ C10 (■, ●) を含む精製*in vitro*系において30℃ 30分間DNA詰込み反応を行い、生じた成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することによりDNA詰込み活性を測定した。詰込み活性をgp19-wtを用いた標準反応液での活性を100%とした相対値で示した。

(B) 2×10^{10} peqのプロヘッド及び各濃度のgp19-wtあるいはgp19 Δ C10を含む精製*in vitro*系において、DNA詰込み反応後DNaseI処理を行ない、アガロースゲル(1%)電気泳動及びエチジウム染色により頭殻内のDNAを観察した。

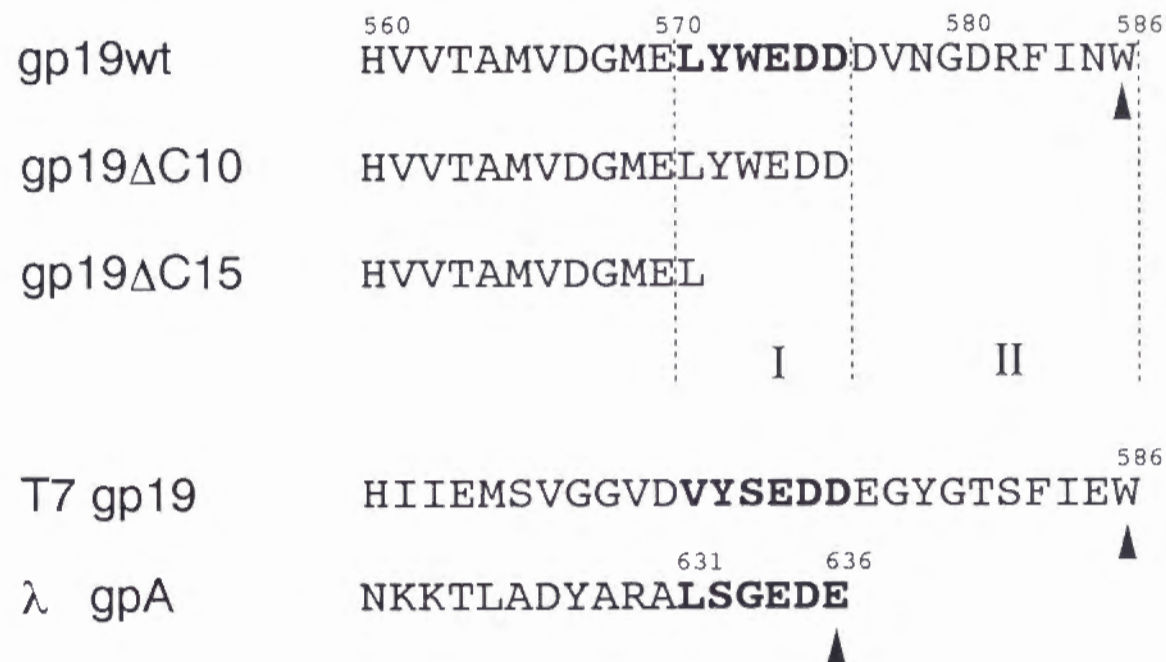


図2-3 詰込み蛋白質大サブユニットのC末端領域のアミノ酸配列

T3のgp19-wt、gp19 Δ C10、gp19 Δ C15、T7gp19、 λ gpAのC末端領域のアミノ酸配列を示している。類似配列を太字で表し、各野生型蛋白質のC末端に矢頭を付した。gp19 Δ C10、gp19 Δ C15の諸活性の相違及び他のフェージとの配列の類似性から、領域I及び領域IIを図のように定義した（本文参照）。

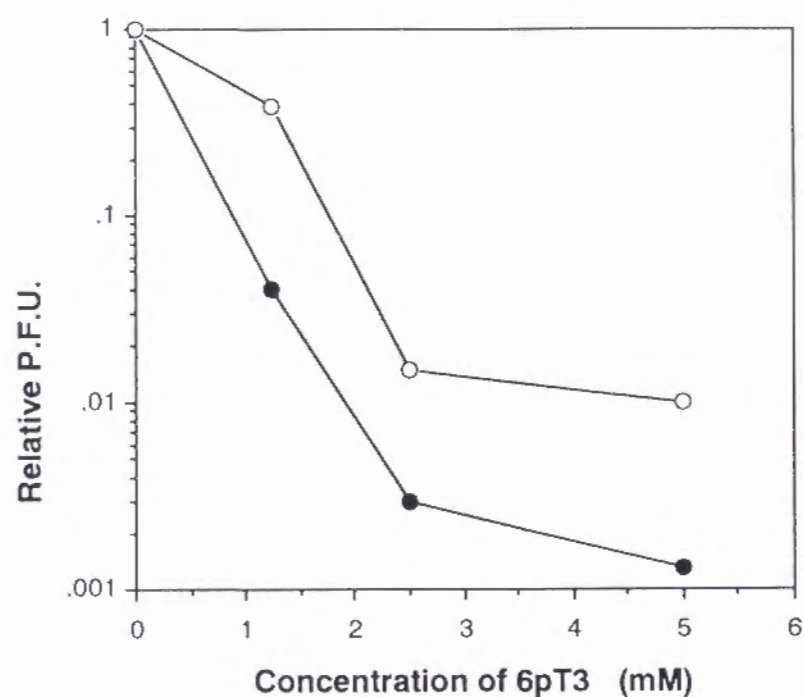


図 2 4 精製 *in vitro* 系における DNA 詰込み活性に及ぼす 6pT3 の影響

gp19を除いた精製 *in vitro* 系に各濃度の 6pT3 を加え、25℃ 10 分間前反応後、gp19-wt (○) あるいは gp19ΔC10 (●) を加え、更に 10 分間反応させた。生じた成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することにより DNA 詰込み活性を測定した。詰込み活性は、6pT3 を含まない反応液での gp19-wt あるいは gp19ΔC10 の活性を 1 とした相対値で示した。

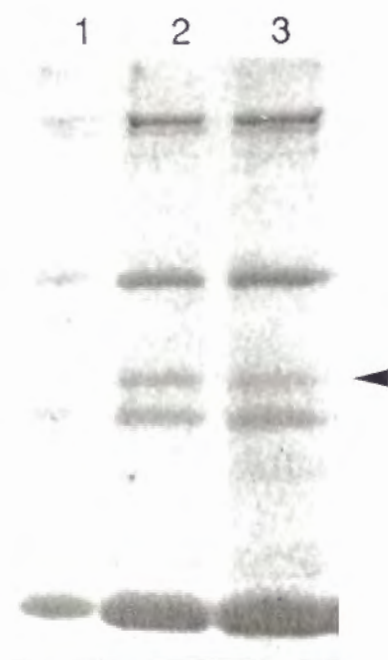


図 2 5 6pT3存在下でのgp19-プロヘッド複合体形成

プロヘッドを5 mM 6pT3を含む (lane 3) あるいは含まない (lane 2) complete pac buffer中で25℃ 10分間前処理し、gp19を加えてさらに10分間反応後、gp19-プロヘッド複合体を分離し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (12.5%) を行なった。lane 1; プロヘッド。矢頭はgp19の泳動位置を示す。

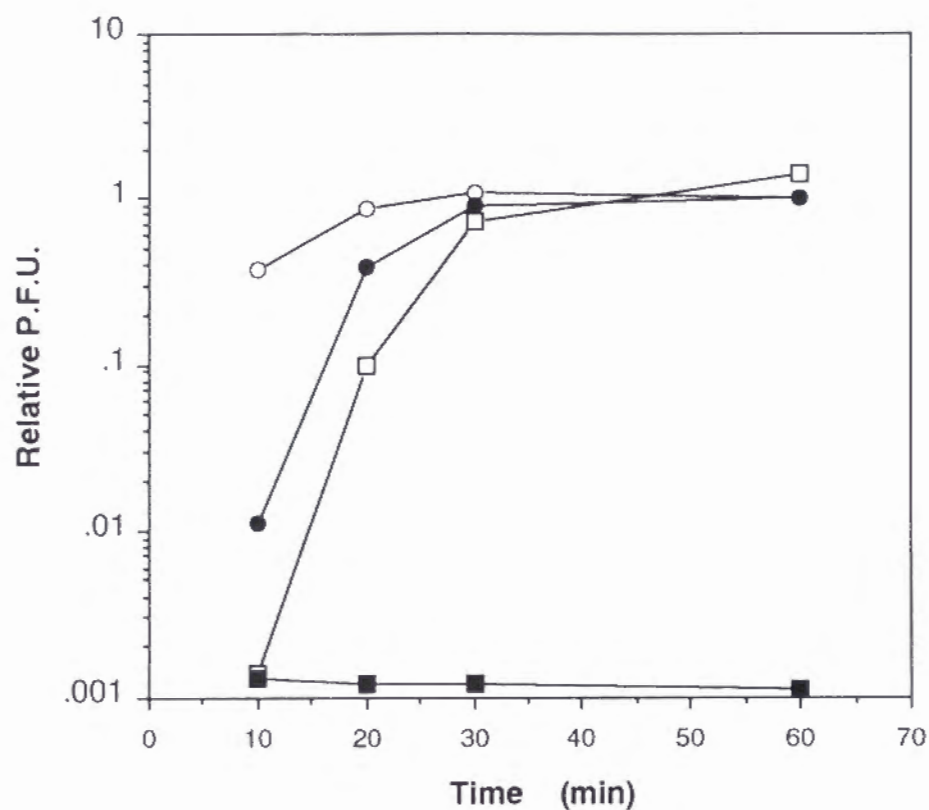


図 2 6 6pT3存在下でのDNA詰込み活性の時間経過

gp19を除いた精製*in vitro*系を5 mM 6pT3存在下 (□ ■) あるいは非存在下 (○, ●) で25°C 10分間前処理後、gp19-wt (○, □) あるいはgp19ΔC10 (●, ■) を加えて各時間反応を行なった。生じた成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することによりDNA詰込み活性を測定した。詰込み活性は、6pT3非存在下でのgp19-wt あるいはgp19ΔC10における60分間反応後の活性をそれぞれ100とした相対値で示した。

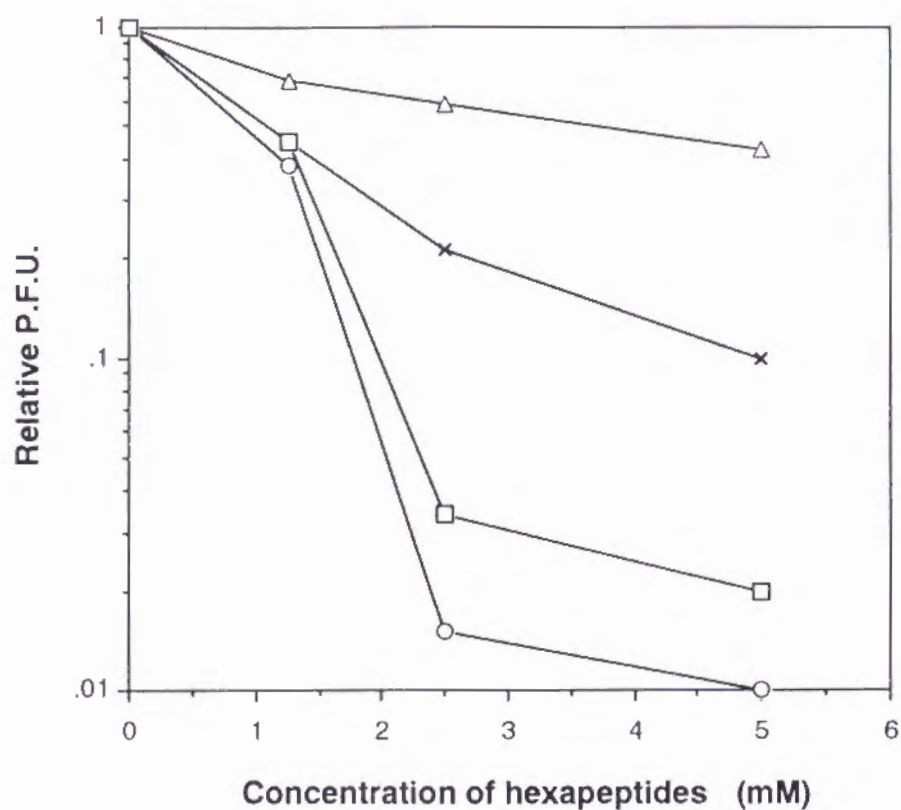


図27 アミノ酸置換ヘキサペプチドのDNA詰込みに及ぼす影響

gp19を除いた精製*in vitro*系を各濃度のアミノ酸置換ヘキサペプチド存在下で25℃ 10分間前処理後、gp19-wtを加えて更に10分間反応させた。生じた成熟頭部に尾部及び尾部繊維を集合させ、感染性粒子を計数することによりDNA詰込み活性を測定した。詰込み活性は、6pT3を含まない反応液でのgp19-wtの活性を1とした相対値で表した。6pT3 (LYWEDD) ; ○、6pλ (LSGEDE) ; ×、6p1V (VYWEDD) ; □、6p6K (LSYWEDK) ; Δ。

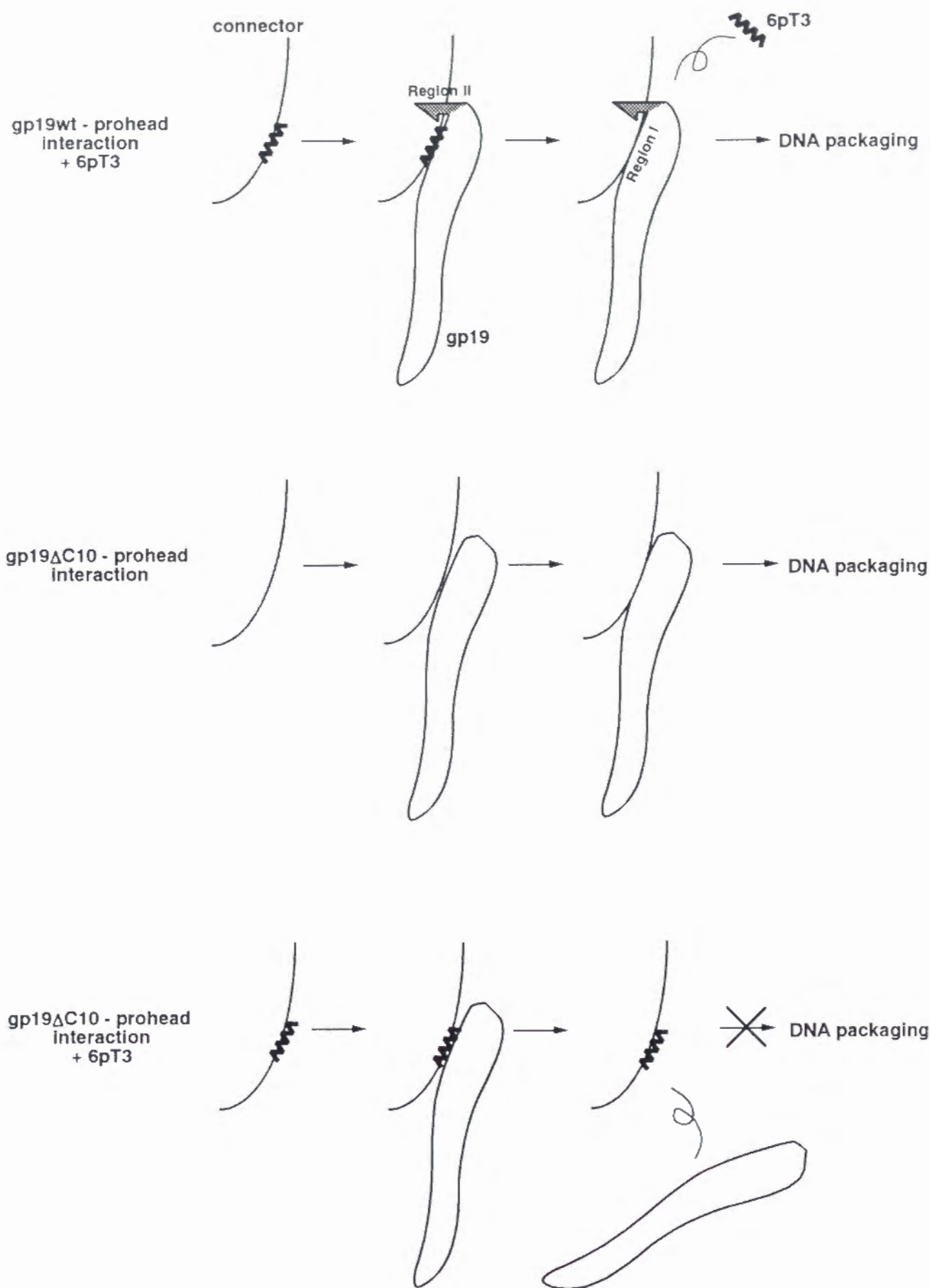


図 2 8 6pT3のgp19-wtあるいはgp19ΔC10のDNA詰込み活性阻害機構の模式図

本文参照。

Phages	Large subunit	A.A.	
T3	gp19	586	LRSTMELDAVKVEAEVLEAFLEEHMEHPHHSAGHVVTAMVDGME LYWEDD DVNGDRFINW
T7	gp19	586	LRESMQLD SVKVEGEVLADFL EEHMMRPTVAATHIIEMSVGGVD VYSEDD EGYGTSFIEW
λ	gpA	641	KRRNEALDCFVYALAALRISISRWQLDLSALLASLQ EEDGAATNKKTLADYARA LSGEDE
21	gp2	641	KRRNEALDCLVYAYAALRVSVQRWQLDLAVLAKS REEETTRPTLKE LAAKLSGGVNGYSR
P1	gppacB	397	ADAALWIEHRREEIADIVDTGGYGDVDAEGISNEAWLEQD LDEDEE EDEEVTRK LYGDDD

図 2 9 詰込み蛋白質大サブユニット C 末端領域のアミノ酸配列比較

次のファージの詰込み蛋白質大サブユニット C 末端領域のアミノ酸配列を示した。T3 (Yamada *et al.*, 1986)、T7 (Dunn and Studier, 1983)、λ (Sanger *et al.*, 1982)、21 (Frackman *et al.*, 1984)、P1 (Skorupski *et al.*, 1992)。A.A.は各大サブユニットのアミノ酸残基数を示す。T3の領域 1 (LYWEDD) に類似する配列を四角で囲み、酸性アミノ酸を太字で示した。

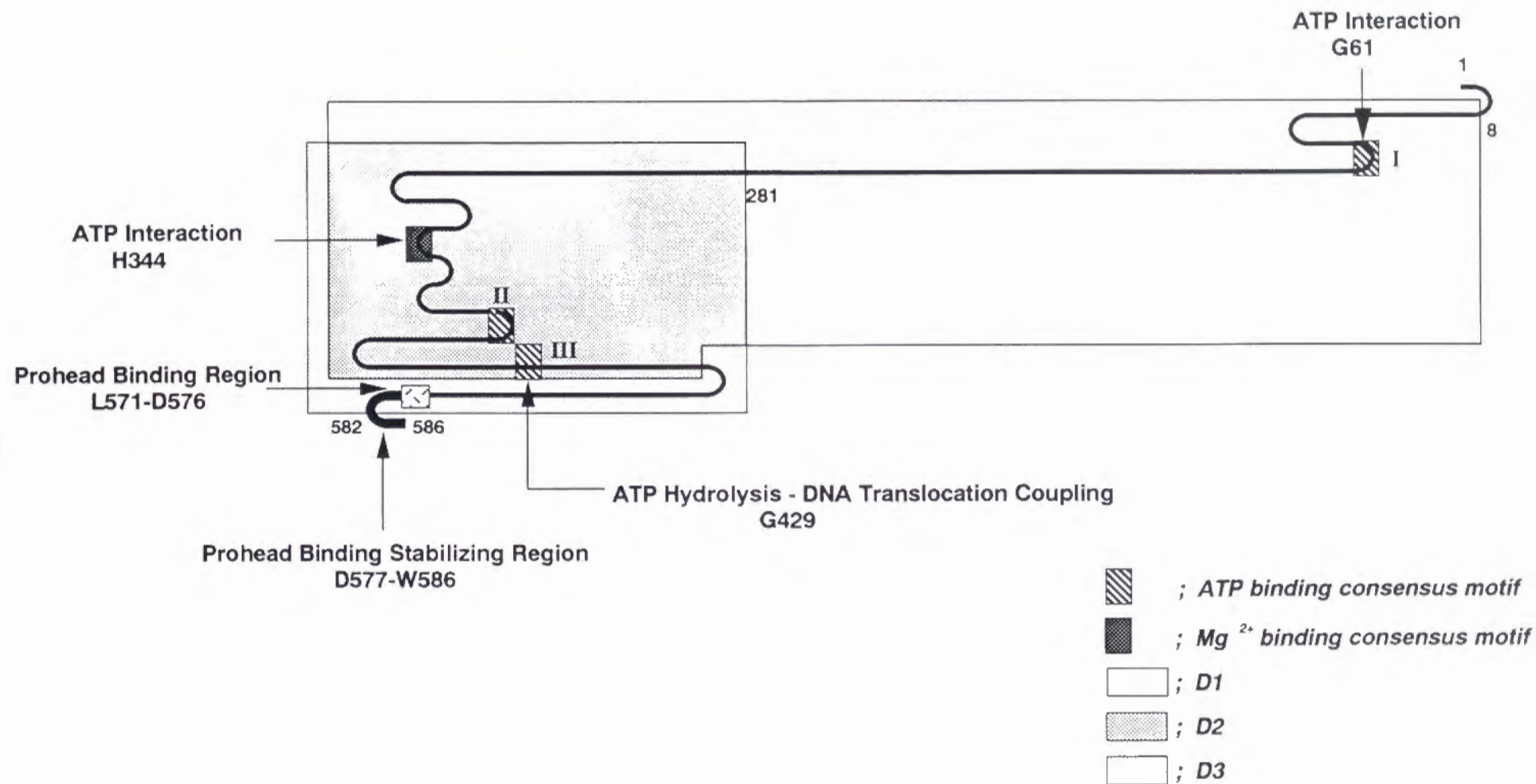


図 3 0 gp19の機能領域

ATP結合共通配列I、II、III及びMg²⁺結合共通配列への変異導入により得られた結果とプロヘッド結合領域I (L576 - D576)、II (D577 - W586) を、プロテアーゼによる限定分解により明らかにした構造上のドメインに相関させて示した (本文参照)。

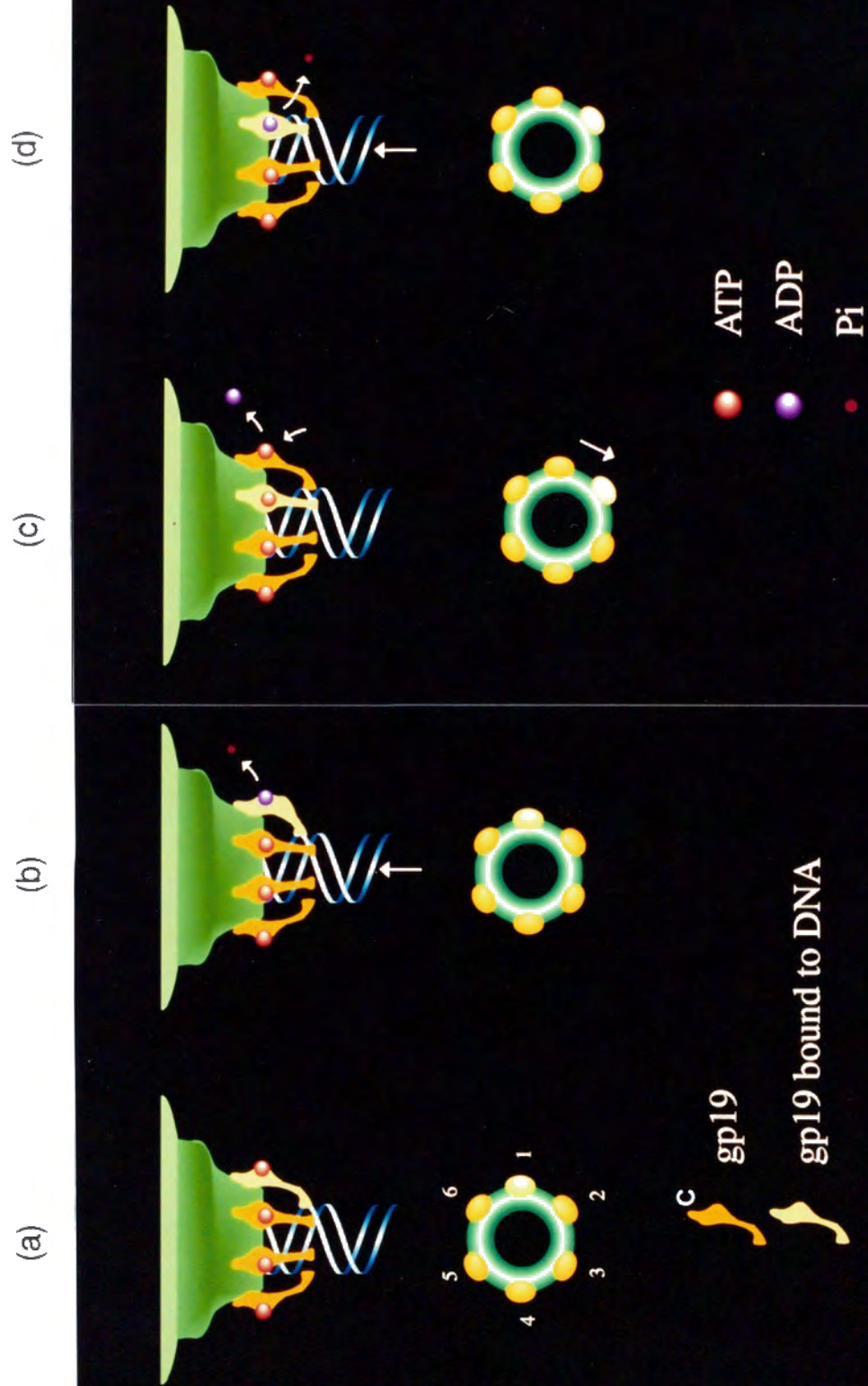
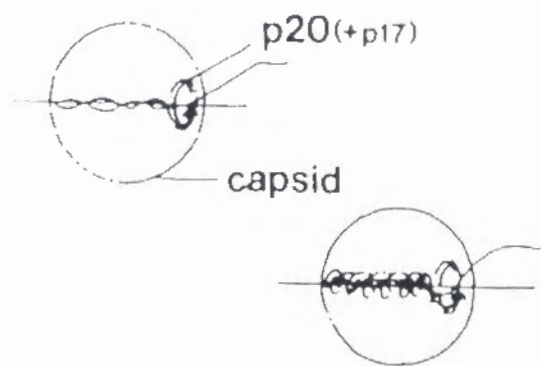


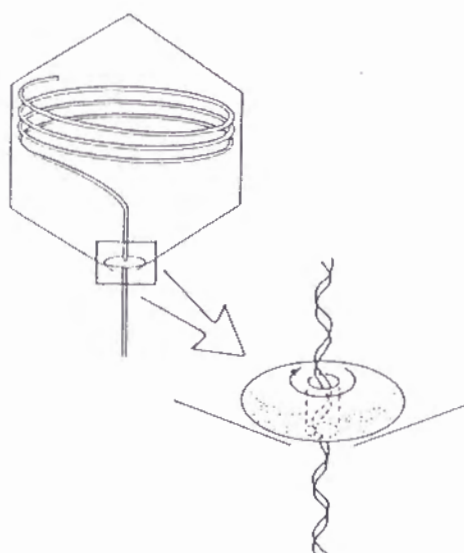
図 3 1 DNA 移送モデル

本文参照。

(A)



(B)



(C)

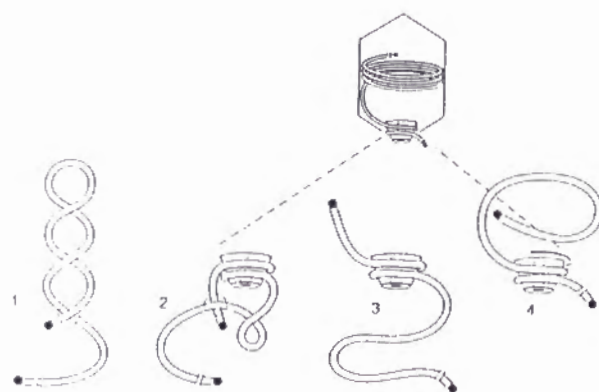


図 3 2 コネクターを中心としたDNA移送モデル

(A) Black and Silverman (1978)のモデル。

(B) Hendrix (1978)のモデル。

(C) Turnquist et al. (1992)のモデル。本文参照。

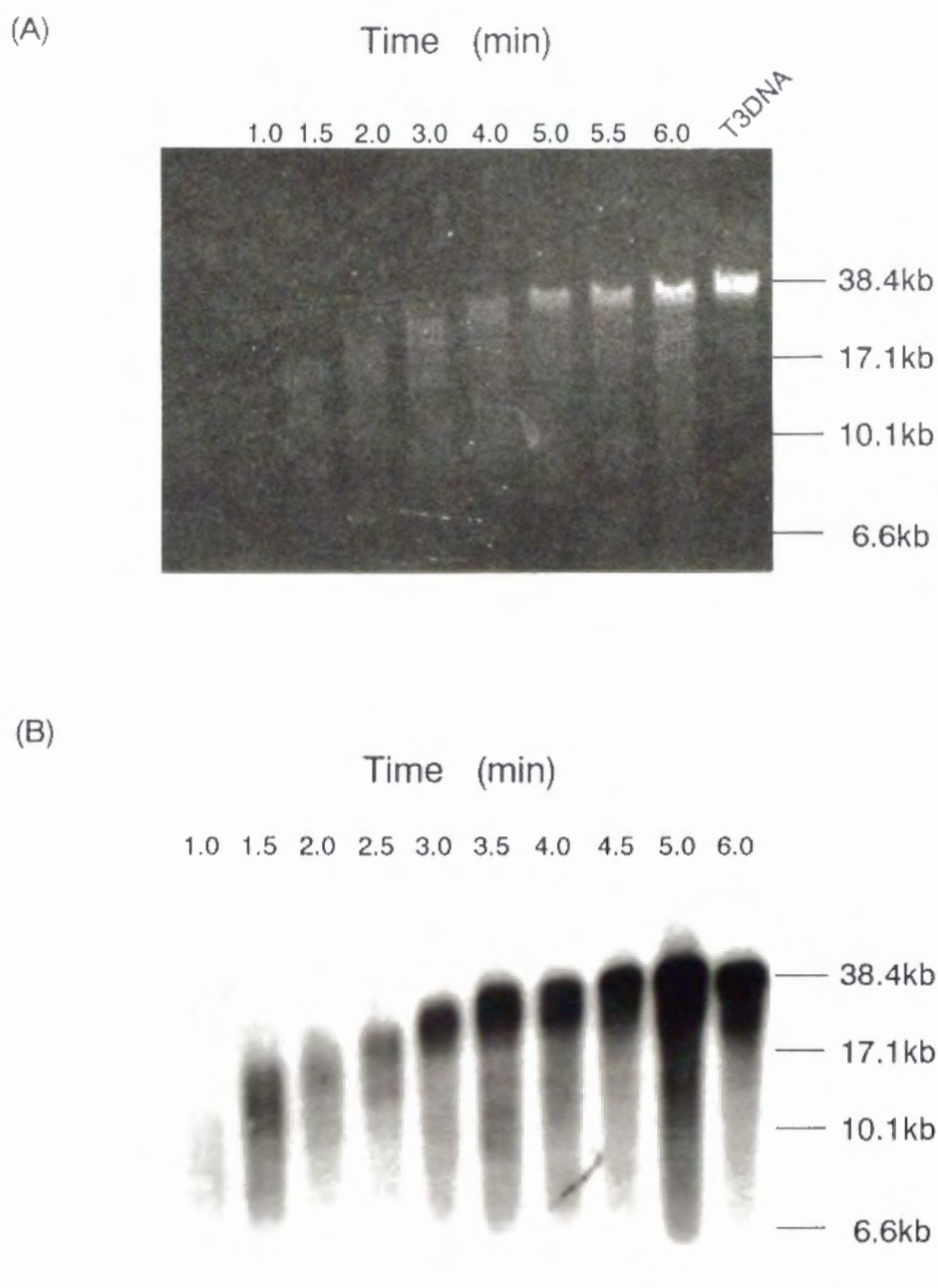


図 3 3 精製 *in vitro* 詰込み同調系における DNA 移送

精製 *in vitro* 詰込み系を改良した同調系に ATP のかわりに $10\mu\text{M}$ の ATP- γ -S を加え、 30°C 20 分間続いて 20°C 10 分間前反応後、 $100\mu\text{M}$ の ATP を加えて DNA 移送を開始させた (材料と方法)。各時間後 DNaseI 処理により反応を停止させ、頭殻内 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動を行い、エチジウム染色 (A) あるいは Southern hybridization (B) により観察した。(C) 各時間における頭殻内 DNA 長を算出し、グラフに示した (次頁)。

(C)

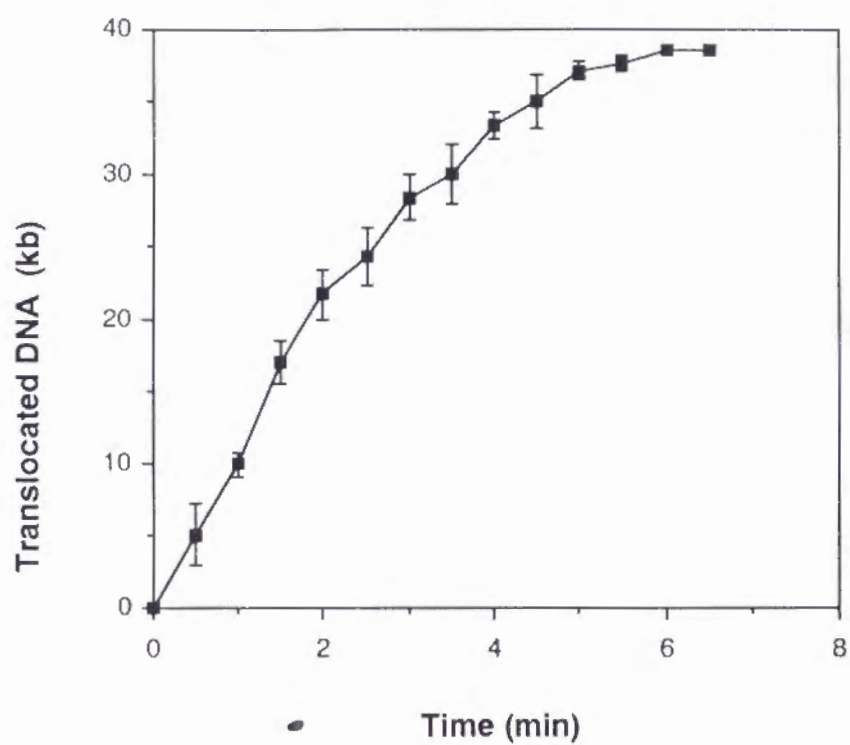
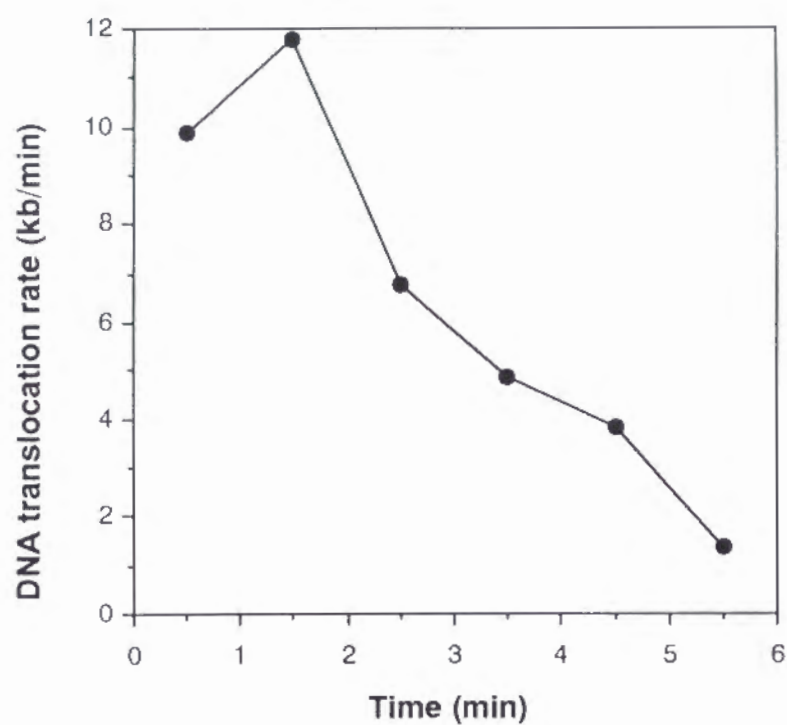


図 3 3 精製 *in vitro* 詰込み同調系における DNA 移送
説明は前頁。

(A)



(B)

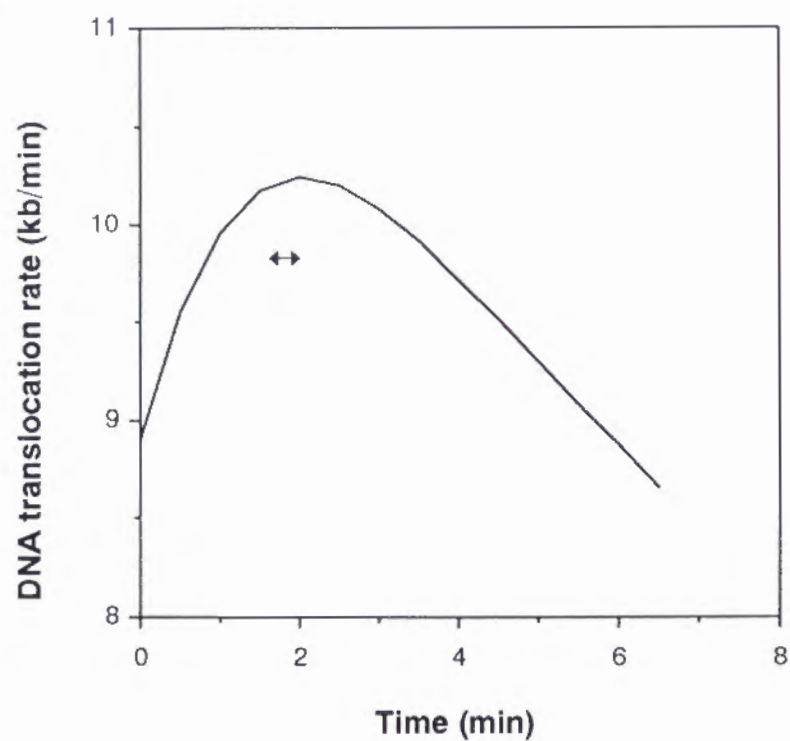


図 3 4 DNA移送速度変化

(A) 1分間おきのDNA長の差から算出したDNA移送速度変化。

(B) 図 3 3 (C) のグラフの近似曲線を微分して得た速度変化。図中にプロヘッド拡大変換が起こる時期を矢印で示した。

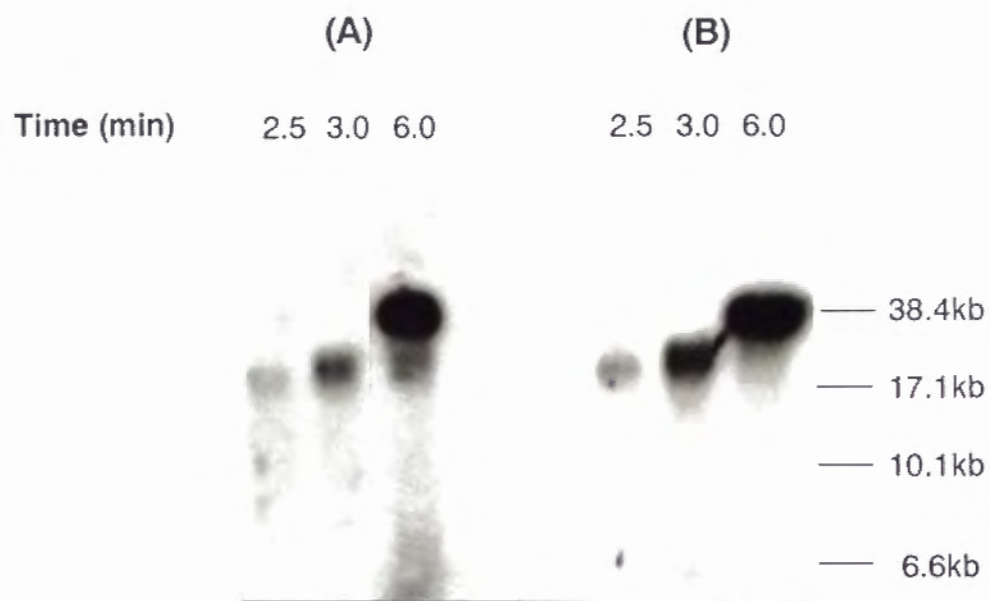


図 3 5 ATP- γ -Sによる頭殻からのDNA飛出し反応

同調系においてDNA移送開始後、(A) 各時間にATP- γ -Sを添加し、0°C 5分後DNaseI処理を行った。(B) ATP- γ -S添加をしないで、各時間にDNaseI処理を行った。頭殻内DNAをパルスフィールドゲル電気泳動を行い、Southern hybridizationにより観察した。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ熱心な御指導と暖かい御批判を賜りました藤澤久雄教授に心から感謝致します。

常に数多くの有益な御助言、御批判を賜りました田坂昌生博士、加藤尚子博士に深く感謝致します。

DNAシーケンシングを御指導戴いた京都大学理学部化学研究所青山卓史博士、DNA合成機及びイメージアナライザーの使用に便宜を御計り戴いた京都大学理学部岩淵雅樹教授、アミノ酸シーケンシングに関して機器の使用の便宜並びに操作を御指導戴いた京都大学食糧科学研究所浅田浩二教授、三上文三博士、理学部和田明博士、ペプチド合成機及びアミノ酸アナライザーの使用の便宜及び操作の御指導を戴いた京都大学化学研究所高橋敏教授に深く感謝致します。

また論文の作製に関して御助力、御批判を賜りましたProf. Michael Feiss (Department of Microbiology, College of medicine, University of Iowa) に心から感謝致します。

最後に、いろいろと御世話になりました当研究室の皆様に御礼申し上げます。

引用文献

- Alberts, B. and Miake-Lye, R. (1992). Unscrambling the puzzle of biological mechanisms: the importance of the details. *Cell*, **68**, 415-420.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. J. Wiley, New York.
- Becker, A., Marko, M. and Gold, M. (1977). Early events in the *in vitro* packaging of bacteriophage λ DNA. *Virology*, **78**, 291-305.
- Berg, J. M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**, 485-487.
- Bjornsti, M-A., Reilly, B. E. and Anderson, D. (1983). Morphogenesis of bacteriophage ϕ 29 of *Bacillus subtilis*: Oriented and quantized *in vitro* packaging of DNA protein gp3. *J. Virol.* **45**, 383-396.
- Black, L.W. and Silverman, D. J. (1978). Model for DNA packaging into bacteriophage T4 heads. *J. Virol.* **28**, 643-655.
- Black, L.W. (1988). DNA packaging in ds DNA bacteriophages. In *The Bacteriophages* (Calendar, R., ed.) vol. 2, pp 321-373. Plenum Press, New York.
- Black, L.W. (1989). DNA packaging in ds DNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 267-292.
- Bowden, D. W. and Calendar, R. (1979). Maturation of bacteriophage P2 DNA *in vitro*: A complex, site-specific system for DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* **129**, 1-18.
- Bowden, D. W. and Modrich, P. (1985). *In vitro* maturation of circular bacteriophage P2 DNA : Purification of *ter* components and characterization of the reaction. *J. Biol. Chem.* **260**, 6999-7007.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Carazo, J. M., Fujisawa, H. Nakasu, S. and Carrascosa, J. L. (1986). Bacteriophage T3 gene 8 product oligomer structure. *J. Ultrastruct. Res.* **94**, 105-113.
- Carrascosa, J. L., Carazo, J. M., Ibanez, C. and Santiesteban, A. (1985). Structure of phage ϕ 29 connector protein assembled *in vivo*. *Virology* **141**, 190-200.
- Casjens, S. (1979). Molecular organization of the bacteriophage P22 coat protein shell. *J. Mol. Biol.* **131**, 1-19.
- Casjens, S. Wyckoff, E., Hayden, M., Sampson, L., Eppler, K., Randell, S., Moreno, E. and Serwer, P. (1992). Bacteriophage P22 portal protein is part of the gauge that regulates packaging density of intravirion DNA. *J. Mol. Biol.* **224**, 1055-1074.
- Davidson, A., Yau, P., Murialdo, H. and Gold, M. (1991). Isolation and Characterization of mutations in the bacteriophage λ terminase genes. *J. Bacteriol.* **173**, 5086-5096.
- Davidson, A. and Gold, M. (1992). Mutations abolishing the endonuclease activity of bacteriophage λ terminase lie in two distinct regions of the A gene, one of which may encode a "leucine zipper" DNA-binding domain. *Virology* **189**, 21-30.

- Dombroski, A. J., Brennan, C. A., Soear, P. and Platt, T. (1988). Site-directed alterations in the ATP-binding domain of Rho protein affects its activity as a termination factor. *J. Biol. Chem.* **263**, 18802-18809.
- Donate, L. E., Herranz, L., Secilla, J. P., Carazo, J. M., Fujisawa, H. and Carrascosa, J.L. (1988). Bacteriophage T3 connector: Three dimensional structure and comparison with other viral head-tail connecting regions. *J. Mol. Biol.* **201**, 91-100.
- Driedonks, R. A., Engel, A., ten Heggeler, B. and van Driel, R. (1981). Gene 20 product of bacteriophage T4: Its purification and structure. *J. Mol. Biol.* **152**, 641-662.
- Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the location of T7 genetic elements. *J.Mol.Biol.* **166**, 477-535.
- Earnshaw, W.C., and Casjens, S.R. (1980). DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages. *Cell* **21**, 319-331.
- Eppler, K., Wyckoff, E., Goates, J., Parr, R., and Casjens, S. (1991). Nucleotide sequence of the bacteriophage P22 genes required for DNA packaging. *Virology* **183**, 519-538.
- Eto, M., Morita, F., Nishi, N., Tokura, S., Ito, T., and Takahashi, K. (1991). Actin polymerization promoted by heptapeptide, an analog of the Actin-binding S site on myosin head. *J. Biol. Chem.* **266**, 18233-18236.
- Feiss, M. (1986). Terminase and the recognition, cutting and packaging of λ chromosome. *Trends Genet.* **2**, 100-104.
- Fujisawa, H., Miyazaki, J. and Minagawa, T. (1978). *In vitro* packaging of phage T3 DNA. *Virology* **87**, 394-400.
- Fujisawa, H. and Sugimoto, K. (1983). On the terminally redundant sequences of bacteriophage T3 DNA. *Virology* **124**, 251-258.
- Fujisawa, H., Hamada, K., Shibata, H. and Minagawa, T. (1987). On the molecular mechanism of DNA translocation during *in vitro* packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* **161**, 228-233.
- Fujisawa, H., Kimura, M. and Hashimoto, C. (1990). *In vitro* cleavage of the concatemer joint of bacteriophage T3 DNA. *Virology* **174**, 26-34.
- Fujisawa, H., Shibata, H., and Kato, H. (1991). Analysis of interactions among factors involved in the bacteriophage T3 DNA packaging reaction in a defined *in vitro* system. *Virology* **185**, 788-794.
- Frackman, S., Siegele, D. A. and Feiss, M. (1984). Functional domain of bacteriophage λ terminase for prohead binding. *J. Mol. Biol.* **180**, 283-300.
- Frackman, S., Siegele, D. A. and Feiss, M. (1985). The terminase of bacteriophage λ : functional domains for cosB binding and multimer assembly. *J. Mol. Biol.* **183**, 225-238.
- Fry, D. C., Kubly, S. A., and Mildvan, A. S. (1986). ATP-binding site of adenylate kinase; Mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **83**, 907-991.

- Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887-898.
- Guo, P., Grimes, S. and Anderson, D. (1986). A defined system for *in vitro* packaging of DNA-gp3 of the *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 3505-3509.
- Guo, P., Peterson, C., and Anderson, D.L. (1987a). Initiation events in *in-vitro* packaging of bacteriophage ϕ 29 DNA-gp3. *J.Mol.Biol.* **197**, 219- 228.
- Guo, P., Peterson, C., and Anderson, D.L. (1987b). Prohead and DNA-gp3-dependent ATPase activity of the DNA packaging protein gp16 of bacteriophage ϕ 29. *J.Mol.Biol.* **197**, 229- 236.
- Guo, P., Erickson, S. and Anderson, D. (1987c). A small viral RNA is required for *in vitro* packaging of bacteriophage ϕ 29 DNA. *Science* **236**, 690-694.
- Hamada, K., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1986a). Overproduction and purification of the products of bacteriophage T3 genes *18* and *19*, two genes involved in DNA packaging. *Virology* **151**, 110-118.
- Hamada, K., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1986b). A defined *in vitro* system for packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* **151**, 119-123.
- Hamada, K., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1987). Characterization of ATPase activity of a defined *in vitro* system for packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* **159**, 244 - 249.
- Hamada, K. (1987). バクテリオファージT3の頭部形成過程におけるDNA詰込み機構. 学位論文.
- Hashimoto, C. and Fujisawa, H. (1988). Packaging and transduction of non-T3 DNA by bacteriophage T3. *Virology* **166**, 432-439.
- Hashimoto, C. and Fujisawa, H. (1992a). DNA sequences necessary for packaging bacteriophage T3 DNA. *Virology* **187**, 788-795.
- Hashimoto, C. and Fujisawa, H. (1992b). Transcription dependence of DNA packaging of bacteriophage T3 and T7. *Virology* **191**, 246-250.
- Hashimoto, C. (1992). バクテリオファージT3のDNA詰込みシグナルの構造と機能. 学位論文.
- Hendrix, R. W. (1978). Symmetry mismatch and DNA packaging in large bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 4779-4783.
- Hinz, H.R., and Kirley, T.L. (1990). Lysine 480 is an essential residue in the putative ATP site of lamb kidney (Na, K)-ATPase. *J.Biol.Chem.* **265**, 10260-10265.
- 平野久 (1988). 電気泳動ゲルからブロッティングした蛋白質のアミノ酸配列分析. 蛋白質核酸酵素 **33**, 2388-2396.
- Hohn, B. (1983). DNA sequences necessary for packaging of bacteriophage lambda DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 7456-7460.
- Hsiao, C. L. and Black, L. W. (1977). Head morphogenesis of bacteriophage T4, III; The role of gene 20 in DNA packaging. *Virology* **91**, 26-38.

- Kimura, M., and Fujisawa, H. (1991). Dissection of functional domains of the packaging protein of bacteriophage T3 by site-directed mutagenesis. *Virology* **180**, 709-715.
- Kistler, J., Abei, U., Onorato, L., ten Heggler, B. and Showe, M. (1978). Structural changes during the transformation of bacteriophage T4 polyheads: Characterization of the initial and final states by freeze-drying and shadowing Fab-fragment-labeled preparations. *J. Mol. Biol.* **126**, 571-589.
- Kochan, J., Carrascosa, J. L. and Murialdo, H. (1984). Bacteriophage lambda preconnectors: Purification and structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 443-447.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D., and Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. In *"Methods in Enzymology"* (R.Wu and L.Grossman, Eds.). Vol. **154**, pp. 367-382. Academic Press, San Diego.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Maruyama, K., and MacLennan, D.H. (1988). Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca^{2+} transport activity of Ca^{2+} -ATPase expressed in COS-cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**, 3314-3318.
- Morita, M., Tasaka, M., and Fujisawa, H. (1993). DNA packaging ATPase of bacteriophage T3. *Virology* **193**, 748-752.
- Morita, M., Tasaka, M., and Fujisawa, H. (1994). Analysis of functional domains of the packaging proteins of bacteriophage T3 by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **235**, 248-259.
- Morita, M., Tasaka, M., and Fujisawa, H. (1995). Structural and functional domains of the DNA packaging protein of bacteriophage T3: Importance of the C-terminal region of the large subunit in prohead binding. *J.Mol.Biol.* **245**, 635-644.
- Murialdo, H., and Becker, A. (1987). Head morphogenesis of complex double-stranded DNA bacteriophages. *Microbiol.Rev.* **42**, 529-576.
- Murialdo, H. (1991). Bacteriophage lambda DNA maturation and packaging. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 125-153.
- Nakasu, S., Fujisawa, H., and Minagawa T. (1985). Purification and characterization of gene 8 product of bacteriophage T3. *Virology* **127**, 124-133.
- Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30-33.
- Parris, W., Rubinchik, S., Yang, Y. and Gold, M. (1994). A new procedure for the purification of the bacteriophage λ terminase enzyme and its subunits: Properties of gene product A, the large subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 13564-13574.
- Rossmann, M. G., Moras, D. and Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature (London)* **250**, 194-199.
- Rubinchik, S., Parris, W. and Gold, M. (1994). The *in vitro* endonuclease activity of gene product A, the

- large subunit of the bacteriophage λ terminase, and its relationship to the endonuclease activity of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **269**, 13575-13585.
- Rubinchik, S., Parris, W. and Gold, M. (1994). The *in vitro* ATPases of bacteriophage λ terminase and its large subunit, gene product A: The relationship with their DNA helicase and packaging activities. *J. Biol. Chem.* **269**, 13586-13593.
- Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual. (second edition)* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 39-71.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. and Paterson, G.B. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* **162**, 729-773.
- Serwer, P. (1988). The source of energy for bacteriophage DNA packaging: An osmotic pump explains the data. *Biopolymers* **27**, 165-169.
- Serwer, P. (1989). Double-stranded DNA packaged in bacteriophages: conformation, energetics, and packaging pathway. In *Chromosomes, Eukaryotic, Prokaryotic and Viral.* (Adolph, K. W., Ed.) pp 203-223, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Shibata, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1987a). Early events in DNA packaging in defined *in vitro* system of bacteriophage T3. *Virology* **159**, 250-258.
- Shibata, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1987b). Characterization of the bacteriophage T3 DNA packaging reaction *in vitro* in a defined system. *J. Mol. Biol.* **196**, 845-851.
- Sippy, J. and Feiss, M. (1992). Analysis of a mutation affecting the specificity domain for prohead binding of the bacteriophage λ terminase. *J. Bact.* **174**, 850-856.
- Skorupski, K., Pierce, J.C., Sauer, B., and Sternberg, N. (1992). Bacteriophage P1 genes involved in the recognition and cleavage of the phage packaging site (*pac*). *J. Mol. Biol.* **223**, 977-989.
- Steven, A., Serwer, P., Bisher, M. and Trus, B. (1983). Molecular architecture of bacteriophage T7 capsid. *Virology* **124**, 109-120.
- Stroud, R. M., Serwer, P. and Ross, M. J. (1981). Assembly of bacteriophage T7: Dimensions of the bacteriophage and its capsids. *Biophys. J.* **36**, 743-757.
- Tavares, P., Santos, M., Lurz, R., Mrelli, G., Lencastre, H. and Trautner, T. A. (1992). Identification of a gene in *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 determining the amount of packaged DNA. *J. Mol. Biol.* **225**, 81-92.
- Thornton, J. M. and Sibanda, B.L. (1983). Amino and carboxyl-terminal regions in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **167**, 443-460.
- Turnquist, S., Simon, M., Egelman, E. and Anderson, D. (1992). Supercoiled DNA wraps around the bacteriophage ϕ 29 head-tail connector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10479-10483.
- Valpuesta, J. M., Fujisawa, H., Marco, S., Carazo, J. M. and Carrascosa J. L. (1992). Three-dimensional structure of T3 connector purified from overexpressing bacteria. *J. Mol. Biol.* **224**, 103-112.

- Walker, J. E., Sarasate, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β - subunits of ATP synthetase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol.* **239**, 197-201.
- Wu, W., Christiansen, S. and Feiss, M. (1988). Domains for protein-protein interaction at the N and C termini of the large subunit of bacteriophage λ terminase. *Genetics* **119**, 477-484.
- Wurtz, M., Kistler, J. and Hohn, T. (1976). Structure of *in vitro* assembled bacteriophage lambda polyheads. *J. Mol. Biol.* **101**, 39-56.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., And Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yamada, M., Fujisawa, H., Kato, H., Hamada, K., and Minagawa, T. (1986). Cloning and sequencing of the genetic right end of bacteriophage T3 DNA. *Virology* **151**, 350-361.
- Yeo, A. and Feiss, M. (1995a). Mutational analysis of prohead binding domain of the large subunit of terminase, the bacteriophage λ DNA packaging enzyme. *J. Mol. Biol.* in press.
- Yeo, A. and Feiss, M. (1995b). Specific interaction of terminase, the packaging enzyme of bacteriophage λ , with the portal protein of the prohead. *J. Mol. Biol.* in press.